


Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke

Dissertation
Margot Mayer
Biologie



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT



Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke

Vom Fachbereich
Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Margot Mayer
geboren am 04.12.1987
in Temeschburg

1. Referent	Prof. Dr. Marco Durante
2. Referent	Prof. Dr. Paul G. Layer

Tag der Einreichung: 22.09.2017
Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

Darmstadt 2017
D17

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Margot Mayer, dass ich die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe. Alle Stellen, Daten, Techniken und Materialien, die Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

In der abgegebenen Thesis stimmen die schriftliche und elektronische Fassung überein.

Darmstadt, den 22.09.2017

(Margot Mayer)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes Pränatal an der Hochschule Aschaffenburg erstellt. Neben dem BioMEMS Labor der Hochschule Aschaffenburg, war auch die Biophysik-Abteilung der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt, sowie die Arbeitsgruppe Stammzelltechnologie und Virologie der Hochschule Albstadt-Sigmaringen an dem Projekt beteiligt. Die Finanzierung erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Ich bedanke mich herzlich bei Fr. Prof. Dr.-Ing. Christiane Thielemann für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der BioMEMS Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Danke für Ihre anhaltende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der letzten fünf Jahre.

Prof. Dr. Marco Durante danke ich für die unmittelbare Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Paul Layer danke ich nicht nur dafür, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat, sondern auch für die anhaltende Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Dr. Sylvia Ritter danke ich für die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit. Vielen Dank für die unzähligen Male, in denen du meine Abstracts, Paper und Berichte korrigiert hast und für die Betreuung und Koordination bei den Strahlzeiten und anderen Experimenten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Onetsine Arrizabalaga de Mingo für die Hilfe und großartige Unterstützung bei der Herstellung der Neurosphären. Ohne dich wäre der Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der BioMEMS Arbeitsgruppe für eine wunderbare Zusammenarbeit bedanken: Florian Emmerich, Manuel Ciba (Vielen Dank, Manu, für deine unendliche Geduld bei der Optimierung und „Reparatur“ von *DrCell*), Berit Körbitzer, Robert Bestel und Tim Köhler (Danke für all die hilfreichen Diskussionen und aufmunternden Worte).

Weiterhin danke ich meinem Freund Dominik Belz und meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit. Ihr habt mir immer das Gefühl gegeben, das ich alles erreichen kann und während des Studiums nie an mir gezweifelt.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung	II
Vorwort	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1.....Motivation und Zielsetzung	1
2.....Einleitung	3
2.1. Mikroelektroden <i>Arrays</i> – Stand der Forschung	3
2.2. Stammzellen	4
2.3. Entwicklung des Nervensystems	7
2.4. Physiologie der Neurone	9
2.5. Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung	12
2.6. Strahlenbelastung des Menschen	15
3.....Material und Methoden	18
3.1. Zellkultur	18
3.1.1. Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen	18
3.1.2. Differenzierung von embryonalen zu neuronalen Stammzellen	18
3.1.3. Herstellung von Neurosphären	19
3.2. Immunhistochemische Färbungen	19
3.3. Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden <i>Arrays</i>	20
3.3.1. Beschichtung der MEA Chips	20
3.3.2. Aussaat kortikaler Rattenneurone auf die MEA Chips	20
3.3.3. Aussaat der Neurosphären auf die MEA Chips	21
3.3.4. Ableitung extrazellulärer Signale mittels MEA Chips	21
3.3.5. Analyse der Messdaten mittels <i>DrCell</i>	23
3.3.6. Reinigung der MEA Chips	26
3.4. Pharmakologische Untersuchungen	27
3.5. Röntgenbestrahlung	27
3.6. Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen	28
3.7. Statistik	29
4.....Ergebnisse	30
4.1. Kortikalen Neurone aus der Ratte	30
4.1.1. Immunhistochemische Charakterisierung	30
4.1.2. Elektrophysiologische Charakterisierung	33
4.2. Röntgenbestrahlung der kortikalen Neurone aus der Ratte	39
4.2.1. Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	39
4.2.2. Elektrophysiologische Eigenschaften nach Exposition mit Röntgenstrahlung	41
4.3. Charakterisierung der Neurosphären	48
4.3.1. Immunhistochemische Charakterisierung	48
4.3.2. Elektrophysiologische Charakterisierung	49

4.3.3.	Pharmakologische Untersuchungen an Neurosphären	55
4.4.	Untersuchungen der Neurosphären, die auf mit Röntgenstrahlung exponierten hESC basieren	59
4.4.1.	Elektrophysiologische Eigenschaften	59
4.4.2.	Größe der Neurosphären	64
4.5.	Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurosphären, die auf mit Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC basieren	64
5.....	Diskussion	70
5.1.	Kortikale Rattenneurone bilden ein funktionales Netzwerk auf den MEA Chips aus	71
5.2.	Netzwerkaktivität kortikaler Rattenneurone wird durch eine Exposition mit Röntgenstrahlung nicht beeinflusst	72
5.3.	Neurosphären bilden funktionale Netzwerke auf den MEA Chips aus	75
5.4.	Auswirkungen einer Exposition mit ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Neurosphären	77
5.4.1.	Eine Exposition der hESC mit Röntgenstrahlung führt zu einer reduzierten Netzwerkaktivität ihrer Abkömmlinge	78
5.4.2.	Eine Exposition der hESC mit Kohlenstoff-Ionen führt zu einer reduzierten Netzwerkaktivität ihrer Abkömmlinge	81
6.....	Zusammenfassung	83
	Literaturverzeichnis	85
	Materialliste	96
	Curriculum Vitae	101
	Publikationen	102
	Poster und Konferenzbeiträge	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials von Stammzellen.	6
Abbildung 2.2:	Die Bildung des Neuralrohres und der Neuralleisten.	8
Abbildung 2.3:	Vorgänge in der Zellmembran, die der Ausbildung eines Aktionspotentials zugrunde liegen.	11
Abbildung 2.4:	Die Dosisverteilung bei einer Röntgenbestrahlung im Vergleich zu einer Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen bei einer gleichen mittleren Dosis von 2 Gy.	13
Abbildung 2.5:	Die Dichte der Ionisationsereignisse ist abhängig von der Energie der Kohlenstoff-Ionen.	14
Abbildung 2.6:	Eindringtiefe von Röntgenstrahlung und Ionenstrahlung im Gewebe.	15
Abbildung 3.1:	Kultivierung kortikaler Rattenneurone auf MEA-Chips.	21
Abbildung 3.2:	Aufbau des MEA-Messsystems im BioMEMS Labor an der Hochschule in Aschaffenburg.	22
Abbildung 3.3:	Spike Detektion durch die Berechnung eines <i>thresholds</i> mit der Software <i>DrCell</i> . ..	24
Abbildung 3.4:	Die Kombination der <i>threshold</i> Berechnung mit dem SWTTEO Algorithmus führt zu einer zuverlässigeren Spike Detektion bei Messungen mit einem schlechten Signal-Rausch Verhältnis.	26
Abbildung 3.5:	Exposition humaner embryonaler Stammzellen mit Röntgenstrahlung an der GSI in Darmstadt.	28
Abbildung 3.6:	Exposition humaner embryonaler Stammzellen mit Kohlenstoff-Ionen am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum.	29
Abbildung 4.1:	Netzwerk kortikaler Rattenneurone an 16 <i>div</i>	31
Abbildung 4.2:	GFAP positive Zellen in einer Kultur kortikaler Rattenneurone an 16 <i>div</i>	32
Abbildung 4.3:	Oligodendrozyten in einer Kultur kortikaler Rattenneurone an 16 <i>div</i>	33
Abbildung 4.4:	Zeitraum elektrischer Aktivität kortikaler Rattenneurone.	34
Abbildung 4.5:	Entwicklung der Anzahl aktiver Elektroden im Laufe der Kultivierung.	35
Abbildung 4.6:	Entwicklung der von kortikalen Rattenneuronen generierten Spikes.	36
Abbildung 4.7:	Entwicklung der von kortikalen Rattenneuronen generierten Bursts.	37
Abbildung 4.8:	Entwicklung der Netzwerkaktivität kortikaler Rattenneurone.	38
Abbildung 4.9:	Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Exposition mit Röntgenstrahlung.	40
Abbildung 4.10:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf den Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität.	41
Abbildung 4.11:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl der aktiven Elektroden.	42

Abbildung 4.12:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl spontan generierter Spikes.	44
Abbildung 4.13:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl spontan generierter Bursts.	46
Abbildung 4.14:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf das elektrische Aktivitätsmuster von Neurosphären.....	47
Abbildung 4.15:	Differenzierungsprotokoll von humanen embryonalen Stammzellen zu Neurosphären.	48
Abbildung 4.16:	Zeitraum elektrischer Aktivität von Neurosphären.....	50
Abbildung 4.17:	Entwicklung der Anzahl aktiver Elektroden im Laufe der Kultivierung.	51
Abbildung 4.18:	Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Neurosphären.....	53
Abbildung 4.19:	Entwicklung der Netzwerkaktivität einer Neurosphäre.....	54
Abbildung 4.20:	Elektrophysiologische Reaktion der Neurosphären auf die Applikation von Carbamazepin.....	56
Abbildung 4.21:	Elektrophysiologische Reaktion der Neurosphären auf die Applikation von Bicucullin.	58
Abbildung 4.22:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf den Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität von Neurosphären.	59
Abbildung 4.23:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl der aktiven Elektroden.	60
Abbildung 4.24:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl an Spikes.....	61
Abbildung 4.25:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl an Bursts.	62
Abbildung 4.26:	Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Entwicklung der Netzwerkaktivität.....	63
Abbildung 4.27:	Größenbestimmung der Neurosphären.....	64
Abbildung 4.28:	Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf den Zeitraum elektrischer Aktivität von Neurosphären.	65
Abbildung 4.29:	Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl der aktiven Elektroden.	66
Abbildung 4.30:	Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl spontan generierter Spikes.	67
Abbildung 4.31:	Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl spontan generierter Bursts.	68
Abbildung 4.32:	Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Entwicklung des Aktivitätsmusters von Neurosphären.....	69

Abkürzungsverzeichnis

bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BrdU	Brom-Desoxyuridin (5-Brom-2'-desoxyuridin)
BSA	bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	<i>Coverslips</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
<i>div</i>	<i>Tage in vitro (days in vitro)</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Gy	Gray
GSI	GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH
ESchG	Embryonenschutzgesetz
hESC	humane embryonale Stammzellen (<i>human embryonic stem cells</i>)
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum
IBI	Interburstintervalle
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
ISI	Interspikeintervalle
IQ	Intelligenzquotient
LET	linearer Energietransfer
MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MEA	Mikroelektroden Array
MEF	embryonale Maus Fibroblasten (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MeHgCl	Methylquecksilberchlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
NB	Netzwerkbursts
NS	Neurosphären
NSC	neurale Stammzellen (<i>neural stem cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i>

PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
RMS	<i>root-mean-square</i> Methode
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SBE	synchrones Burstereignis
SOBP	<i>spread out bragg-peak</i>
StZG	Stammzellgesetz

1. Motivation und Zielsetzung

Eine *in utero* Exposition mit ionisierender Strahlung kann zu schwerwiegenden Schädigungen des Organismus führen. Obwohl diese Gefahr bekannt ist, kann eine Strahlenexposition *in utero* nicht immer vermieden werden, wie beispielsweise bei einer diagnostischen oder therapeutischen Anwendung von ionisierender Strahlung zu einem Zeitpunkt, wenn die Schwangerschaft noch nicht bekannt ist oder bei einem Strahlenunfall. Tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen und Ratten, sowie epidemiologische Studien beim Menschen, z.B. an den Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki, deuten darauf hin, dass der sich entwickelnde Embryo bzw. Fetus empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung ist, als der erwachsene Organismus [1, 2]. Das Risiko dieser Folgeschäden ist dabei abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos zum Zeitpunkt der Bestrahlung, sowie von der applizierten Strahlendosis. Epidemiologische Studien an den Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki zeigten, dass eine *in utero* Exposition mit ionisierender Strahlung während der Organbildungsperiode (2-7 Wochen nach Empfängnis) oder der frühen Fetalperiode (8-15 Wochen nach Empfängnis) das Risiko kognitiver Defizite oder Wachstumsstörungen (z.B. Mikrozephalie) erhöht [3, 4].

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zu einem besseren Verständnis der Bestrahlungseffekte auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke beizutragen. Dabei wurden sowohl die Effekte von dünn-ionisierender Röntgenstrahlung, als auch von dicht-ionisierender Kohlenstoff-Ionen Strahlung untersucht. Die eingesetzten Strahlendosen wurden so gewählt, dass sie denjenigen in therapeutischen Anwendungen nahe kommen.

Als Zellkulturmodell wurden zwei Systeme unterschiedlicher Komplexität verwendet. Einerseits kamen kortikale Neurone aus der Ratte und andererseits dreidimensionale, auf humanen embryonalen Stammzellen (hESC) basierende Neurosphären (NS) zum Einsatz. Bei Ersteren handelt es sich um primäre, postmitotische Zellen aus 18 Tage alten Rattenembryonen. Sie stellen ein stabiles und gut etabliertes 2D-Modellsystem dar und wurden verwendet um den Einfluss ionisierender Strahlung auf differenzierte Neurone zu untersuchen. Das 3D-Modellsystem der auf hESC basierenden NS hingegen wurde im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert und bietet viele Vorteile. So können bereits die hESC mit ionisierender Strahlung exponiert und die überlebenden Zellen als Grundlage für die Differenzierung zu Neuronen verwendet werden. Durch diesen Versuchsaufbau wird eine *in utero* Exposition besser nachgebildet, als mit primären Zellen. Des Weiteren werden die *in vivo* vorhandenen Zell-Zell-Kontakte, sowie die Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen besser dargestellt, als in zweidimensionalen Zellmodellen. Ferner handelt es sich hierbei um ein humanes Modellsystem, so dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erhöht wird [5]. Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften erfolgte durch die nicht-invasive Methode der

Mikroelektroden *Array* (MEA) Chips, die eine langzeitstabile Untersuchung der *in vitro* Kulturen ermöglicht.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen, die Auswirkungen einer Strahlenexposition auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des sich entwickelnden Nervensystems besser einschätzen zu können.

2. Einleitung

2.1. Mikroelektroden *Arrays* – Stand der Forschung

Als besonders effektive Herangehensweise, um elektrophysiologische Untersuchungen an neuronalen Netzwerken durchzuführen, hat sich die Methode der Mikroelektroden *Arrays* herauskristallisiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde sie für alle elektrophysiologischen Analysen verwendet.

MEA Chips erlauben die Messung der elektrischen Aktivität auf zellulärer Ebene und besitzen hohes Potential für eine Vielzahl von Anwendungen in der Grundlagen- und angewandten Forschung. Bei dieser Methode werden dissoziierte Zellen, reaggregierte zelluläre Netzwerke, Gewebe oder Gewebeschnitte auf planaren Mikroelektroden kultiviert und die elektrische Aktivität extrazellulär gemessen. Die Referenzelektrode ist dabei mit großem Abstand zu den Messelektroden und den zu messenden Zellen positioniert. Zwischen den Zellen und den Messelektroden befindet sich ein mit Zellkulturmedium gefüllter Spalt von einigen Nanometern [6]. Der durch Aktionspotentiale generierte Ionenstrom führt in diesem Bereich zu einer schnellen Potentialänderung, die durch die Mikroelektroden detektiert wird [7].

Der Vorteil dieser Methode liegt dabei eindeutig in der nicht-invasiven Messmethodik. Dadurch lassen sich, im Gegensatz zu konventionellen intrazellulären Detektionsverfahren, wie beispielsweise *Patch-Clamp* [8], neben akuten auch Langzeitexperimente durchführen.

Der erste MEA Chip für eine *in vitro* Anwendung wurde 1972 von Thomas et al. vorgestellt [9]. Mithilfe dieser Chips wurden elektrische Feldpotentiale von spontan kontrahierenden Kardiomyozyten aus dem Huhn detektiert. Die erste extrazelluläre Ableitung neuronaler Aktivität erfolgte acht Jahre später durch Pine et al. [10]. Seither werden Mikroelektroden *Arrays* kontinuierlich weiterentwickelt und erfolgreich sowohl *in vitro* [11, 12], als auch *in vivo* [13-16] eingesetzt.

So wurde gezeigt, dass Rattenneurone in einfachen 2D-Kulturen auf MEA-Chips kultiviert und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften in Anwesenheit von Toxikantien untersucht werden können [17-19]. M. Chiappalone überprüfte beispielsweise die Auswirkung unterschiedlicher Antikonvulsiva auf die spontane Netzwerkaktivität hippocampaler Neurone aus der Ratte und konnte dadurch zeigen, dass die Zugabe des Antiepileptikums Valproat zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Netzwerkaktivität führt [20]. Seit einigen Jahren kommen neben diesen 2D-Kulturen vermehrt dreidimensionale Zellmodelle, wie beispielsweise Neurosphären, zum Einsatz. Immer mehr Studien belegen, dass 3D-Modelle die *in vivo* Situation in Hinblick auf die Zellmorphologie [21], das Proliferations- [22] und Migrationsverhalten [23], die Genexpression [24], Differenzierungsprozesse [25], sowie elektrophysiologische Charakteristika genauer widerspiegeln [26]. Dies führt zu einer höheren Relevanz der damit erzielten Ergebnisse [5].

Die Kopplung einzelner Neurosphären an MEA Chips und die Analyse der zellulären Reaktionen stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dies durch entsprechende Versuchsprotokolle möglich ist [27, 28]. Neben neuronalen Zellen aus der Ratte, kommen in den letzten Jahren bevorzugt humane Neurone zum Einsatz. Diese werden in der Regel aus hESC hergestellt [28-32]. So entwickelten Smith et al. [31] ein neuronales Zellmodell, bei dem die Zellen mithilfe eines hochporösen Polystyrol-Gerüsts in einer dreidimensionalen Form kultiviert werden können. Neben immunhistochemischen Untersuchungen wurden hier auch konventionelle, pharmakologische Studien auf MEA Chips durchgeführt. Des Weiteren wurde von einer finnischen Arbeitsgruppe ein dreidimensionales, neuronales Zellmodell entwickelt, das auf hESC basiert [29, 30]. Nach erfolgreicher Charakterisierung der elektrischen Signale [29], wurden die Zellen unter anderem einer Exposition mit Methylquecksilberchlorid (MeHgCl) ausgesetzt [30]. Während konventionelle biologische Endpunkte, wie beispielsweise die Analyse der Zellproliferation oder die morphologische Betrachtung diverser Zelltypen mithilfe von immunhistochemischen Methoden, keine MeHgCl induzierten Veränderungen zeigten, konnte in ersten Experimenten mit den MEA Chips eine konzentrationsabhängige Verringerung der Netzwerkaktivität beobachtet werden.

Die erste Arbeitsgruppe, die die MEA Technologie für die Strahlenbiologie angewendet hat, ist die Arbeitsgruppe von Prof. Thielemann an der Hochschule Aschaffenburg. Hierbei wurden primäre Kardiomyozyten aus dem Huhn auf MEA Chips kultiviert und anschließend einer Exposition mit Röntgendosen von 0,5 Gy bis 7 Gy ausgesetzt [33]. Dabei zeigte sich, dass sich die Schlagrate des kardialen Netzwerks nach Bestrahlung dosisabhängig erhöhte. Dieser Effekt trat bereits 30 Minuten nach der Exposition mit Röntgenstrahlung auf und war auch noch nach sieben Tagen deutlich zu erkennen. Des Weiteren wurde infolge der Bestrahlung eine Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer festgestellt.

2.2. Stammzellen

Der Begriff Stammzelle wurde erstmals 1868 von dem deutschen Biologen Ernst Haeckel eingeführt. Er verwendete diesen Terminus in seiner Arbeit über die „Natürliche Schöpfungsgeschichte“, um einzellige Organismen zu beschreiben, die er als entwicklungsgeschichtlichen Ursprung und Vorläufer aller mehrzelligen Lebewesen betrachtete [34]. Im Jahr 1877 erweiterte er seine Definition der Stammzellen und schlug diesen Begriff auch für eine befruchtete Eizelle vor, welche in der Lage ist, sich in alle Zellen eines Organismus zu entwickeln [35]. In den nachfolgenden Jahren griffen immer mehr Forscher den Begriff der Stammzelle auf und verwendeten ihn in Bezug auf die Keimplasmatheorie und die Entwicklung und Regeneration des hämatopoetischen Systems [36]. Mit dem Nachweis hämatopoetischer Stammzellen [37, 38] etablierte sich die heutige Begriffsbedeutung der Stammzelle als eine Art Vorläuferzelle, die sich unbegrenzt selbst erneuern kann.

Stammzellen können anhand ihres Differenzierungspotentials klassifiziert werden (Abbildung 2.1). In Säugetieren besitzen nur die befruchtete Eizelle (Zygote), sowie die frühen Blastomere bis etwa zum 4-Zell-Stadium das Potential, sowohl den gesamten Embryo, als auch das extraembryonale Gewebe (Plazenta) zu bilden. Diese Stammzellen werden als toti- bzw. omnipotent bezeichnet [39]. Mit voranschreitender Embryonalentwicklung differenzieren die Blastomere in eine innere (Embryoblast) und eine äußere (Trophoblast) Zellmasse und verlieren dadurch ihre Totipotenz. Während der Trophoblast den embryonalen Teil der Plazenta ausbildet, entwickeln sich aus dem Embryoblast die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm), aus denen sich alle Strukturen und Organe des späteren Individuums ableiten. Da die Zellen des Embryoblasten jedoch nicht mehr das Potential besitzen das extraembryonale Gewebe des Trophoblasten zu entwickeln und aus ihnen daher kein vollständiges Individuum hervorgehen kann, werden sie als pluripotente Stammzellen bezeichnet [39]. Stammzellen spielen jedoch nicht nur während der embryonalen und fetalen Entwicklung eine zentrale Rolle, sondern übernehmen auch in adulten Organismen essentielle Funktionen. Diese adulten Stammzellen werden auch als somatische Stammzellen bezeichnet und kommen in zahlreichen Geweben oder Organsystemen vor, wie beispielsweise im Gehirn, in der Darminnenwand, im Knochenmark, im Blut, in den Muskeln, in der Haut und in der Leber [39, 40]. Hier erfüllen sie wichtige Funktionen in der zellulären Homöostase, indem sie alterndes oder beschädigtes Zellmaterial ersetzen und somit die Funktionsfähigkeit der verschiedenen Gewebe und Organe aufrechterhalten. Im Gegensatz zu embryonalen, besitzen adulte Stammzellen nicht mehr die Fähigkeit, sich in jedes beliebige Gewebe zu differenzieren, sondern nur noch in verschiedene Zellarten eines Gewebes wie z.B. hämatopoetische, neurale und mesenchymale Stammzellen. Sie werden daher als multipotent bezeichnet [39]. Die Stammzellen mit dem geringsten Differenzierungspotential werden unipotent genannt [39]. Diese Zellen können nur noch in den Zelltyp differenzieren, dem sie selbst angehören (z.B. spermatogoniale Stammzellen). Sie unterscheiden sich von ausdifferenzierten Zellen nur noch durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [41].

Die ersten embryonalen Stammzellen wurden im Jahre 1981 von M.J. Evans und M.H. Kaufman [42] und zur selben Zeit auch von G.R. Martin [43] aus der inneren Zellmasse einer sich entwickelnden Mausblastozyste isoliert und *in vitro* kultiviert. In den darauffolgenden Jahren gelang es immer mehr Forschern embryonale Stammzellen aus diversen Organismen zu isolieren, wie beispielsweise aus Hamstern [44], Kaninchen [45], Schweinen [46], Schafen [47], Rindern [46] und Affen [48]. Diese bahnbrechenden Arbeiten führten schließlich zur Isolierung der ersten humanen embryonalen Stammzelllinie im Jahre 1998 durch J.A. Thomson [49].

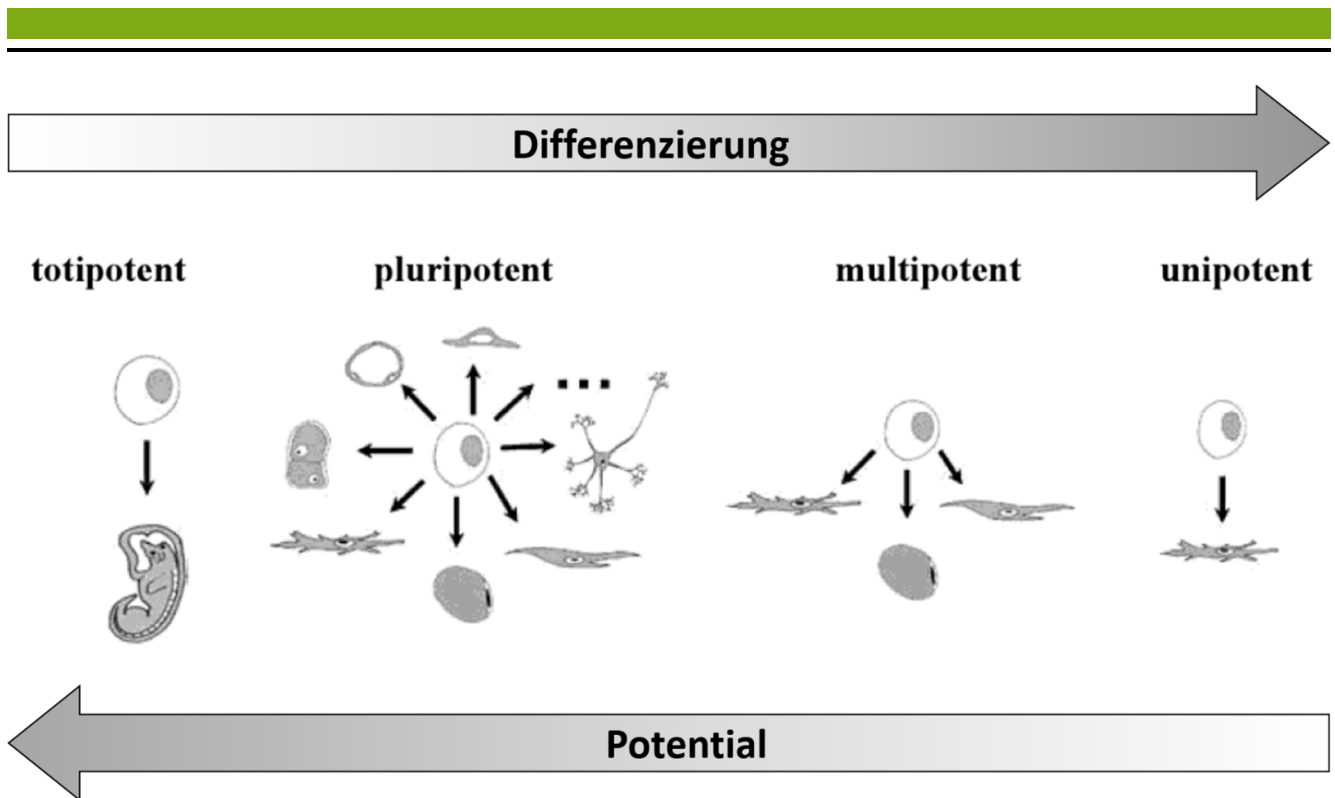


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials von Stammzellen. Stammzellen können anhand ihres Differenzierungspotentials klassifiziert werden. Die fortschreitende Differenzierung geht mit einem Verlust des Differenzierungspotentials einher. Während sich aus totipotenten Stammzellen unter geeigneten Bedingungen ein vollständiger Organismus entwickeln kann, können unipotente Stammzellen nur in einen Zelltypen differenzieren. Modifizierte Abbildung nach [41].

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrbarkeit und ihres nahezu uneingeschränkten Differenzierungspotentials, stellen humane embryonale Stammzellen eine vielversprechende Quelle humaner Zellen, sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für die klinische Forschung, dar. Da die Isolierung embryonaler Stammzellen das Opfern eines fünf Tage alten Embryos erfordert, ist dieses Verfahren ethisch jedoch sehr umstritten und gesetzlich strengstens reguliert. In Deutschland wird die embryonale Stammzellforschung durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG) [50], sowie das Stammzellgesetz (StZG) [51] geregelt. Das Embryonenschutzgesetz verbietet die Erzeugung von Embryonen für die Stammzellforschung oder die Gewinnung von Stammzellen aus vorhandenen Embryonen in Deutschland. Des Weiteren ist auch der Import embryonaler Stammzellen aus dem Ausland durch das Stammzellgesetz streng reguliert (§4 StZG). Die Embryonen, aus denen die hESC gewonnen wurden, müssen im Wege der medizinisch unterstützen extrakorporalen Befruchtung, zum Zwecke der Herbeiführung einer Schwangerschaft, erzeugt worden sein. Ferner müssen die embryonalen Stammzellen, in Übereinstimmung mit der Rechtslage im Herkunftsland, dort vor dem 1. Mai 2007 gewonnen worden sein.

Im Jahr 2007 entwickelte Shinya Yamanaka ein Verfahren, mit dessen Hilfe humane adulte Fibroblasten erfolgreich in pluripotente Zellen reprogrammiert werden konnten [52]. Diese Zellen werden induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) genannt und haben den Vorteil, dass sie in ethischer und rechtlicher

Hinsicht weniger problematisch sind, als embryonale Zelllinien. Ein weiterer Vorteil der iPS Technologie stellt die Gewinnung patienteneigener und somit krankheitsspezifischer Stammzellen für Zelltherapien dar. Es gibt jedoch Studien die darauf hindeuten, dass es zwischen iPS Zellen und embryonalen Stammzellen gravierende Unterschiede gibt, wie beispielsweise den epigenetischen Hintergrund und die genetische Stabilität [53].

2.3. Entwicklung des Nervensystems

Die Entwicklung des Nervensystems wird als Neurulation bezeichnet und ist in die primäre und die sekundäre Neurulation gegliedert. Während bei der primären Neurulation der rostrale Teil des Neuralrohres entsteht, führt die sekundäre Neurulation zur Bildung des kaudalen Abschnittes.

Im Laufe der vorangegangenen Gastrulation haben sich bereits die drei Keimblätter gebildet, aus denen später die verschiedenen Organe und Gewebe hervorgehen [54]. Aus dem innen liegenden Entoderm gehen die Epithelien des Verdauungstraktes, der Leber, der Lunge, der Harnblase und der Harnröhre hervor. Aus der Zwischenschicht, dem sogenannte Mesoderm, entwickeln sich das Blut, das Herz, die Nieren, die Gonaden, die Knochen, die Muskeln und das Bindegewebe. Aus dem außen liegende Ektoderm entstehen hauptsächlich das Nervensystem und die Epidermis.

Die primäre Neurulation beginnt beim Menschen in der dritten Schwangerschaftswoche, durch eine von der Chorda dorsalis induzierten Umwandlung des über ihr befindlichen Ektoderms zur Neuralplatte. Zu diesem frühen Zeitpunkt besteht das primitive, embryonale Nervensystem lediglich aus einer flachen Schicht ektodermaler Zellen (Abbildung 2.2A). In einem nächsten Schritt bildet sich in der Neuralplatte eine Furche, die als Neuralrinne bezeichnet wird und von rostral nach caudal verläuft (Abbildung 2.2B). Die an diese Neuralrinne angrenzenden Wände werden als Neuralwülste bezeichnet. Diese nähern sich einander an und verschmelzen letztendlich an der dorsalen Seite miteinander. Als Resultat dieses Prozesses ist das Neuralrohr entstanden (Abbildung 2.2C). Aus den Wänden des Neuralrohres entwickelt sich das gesamte Nervensystem [55]. Bei der Verschmelzung der Neuralwülste kommt es des Weiteren zur Abschnürung eines Teiles des neuralen Ektoderms. Dieses Gewebe wird als Neuralleiste bezeichnet und befindet sich nach der Abschnürung lateral des Neuralrohres (Abbildung 2.2C-D). Aus den Neuralleisten entwickeln sich alle Neurone, deren Zellkörper im peripheren Nervensystem lokalisiert sind [55]. Die Entwicklung der Neuralleisten ist eng mit dem des darunter liegenden Mesoderms verbunden. Dieses bildet lateral an jeder Seite des Neuralrohres sogenannte Somiten aus, aus denen die 34 Wirbel der Wirbelsäule, sowie die damit zusammenhängende Skelettmuskulatur hervorgehen.

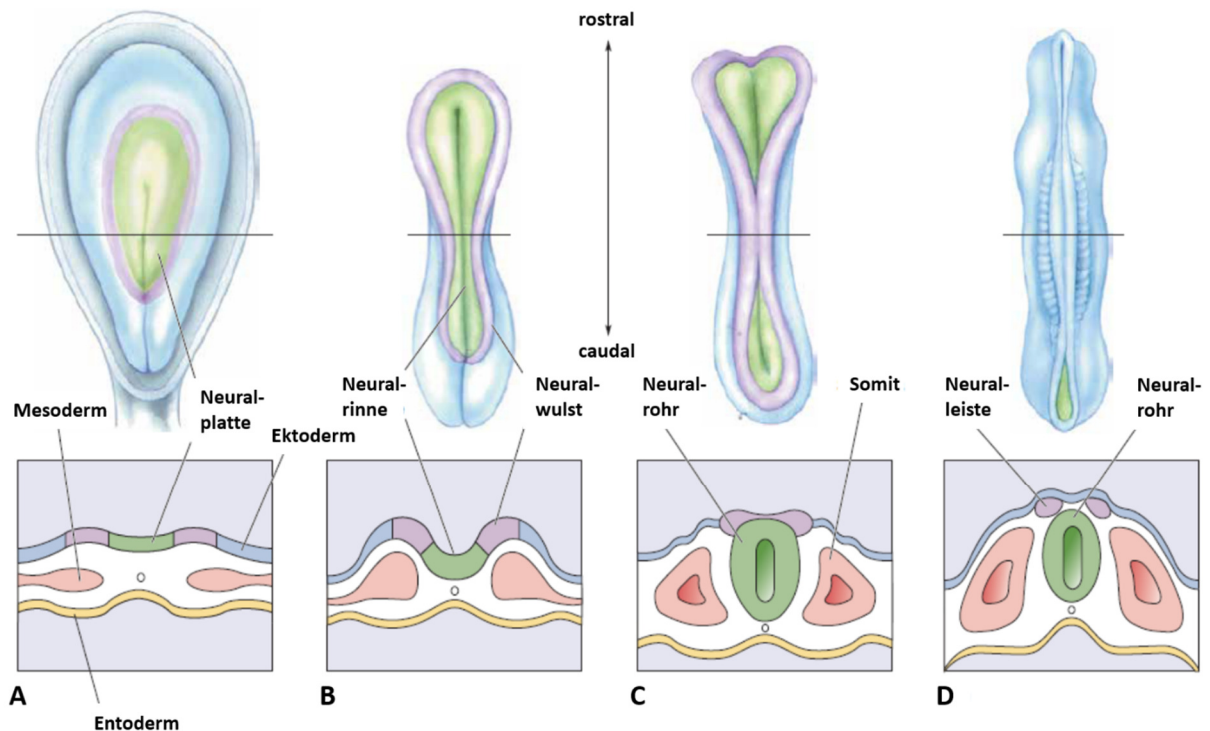


Abbildung 2.2: Die Bildung des Neuralrohrs und der Neuralleisten. Die Abbildung veranschaulicht schematisch die frühe Entwicklung des humanen Nervensystems. Während die oberen Abbildungen die Dorsalansicht auf den Embryo repräsentieren, stellen die unteren Zeichnungen den Querschnitt dar. Durch mesodermale Signale entwickelt sich das darüber liegende Ektoderm zum Neuroektoderm und bildet die Neuralplatte aus (A). In der Neuralplatte bildet sich eine Furche aus, die als Neuralrinne bezeichnet wird und von rostral nach caudal verläuft (B). Die Wände der Neuralrinne, die Neuralwülste, verschmelzen dorsal miteinander und führen dadurch zur Entstehung des Neuralrohrs (C). Bei der Verschmelzung der Neuralwülste wird ein Teil des Neuroektoderms abgeschnürt und anschließend als Neuralleiste bezeichnet. Aus diesem Gewebe entwickelt sich das periphere Nervensystem (D). Modifizierte Abbildung nach [55].

Die primäre Neurulation endet mit dem Verschluss des Neuralrohrs. Dieser findet am rostralen Ende (anterioren Neuroporus) an Tag 24-25 und am kaudalen Ende (posterioren Neuroporus) an Tag 27-28 der Schwangerschaft statt [56]. Im Anschluss an die primäre, erfolgt die sekundäre Neurulation, bei der die Strukturen caudal des posterioren Neuroporus gebildet werden. Diese entstehen aus der sogenannten kaudalen Zellmasse, bei der es sich um undifferenzierte Zellen handelt, die aus einer Fusion des neuralen Ektoderms und kaudaler Chorda dorsalis hervorgegangen sind. Innerhalb dieser Zellmasse kommt es etwa ab dem 30. Tag der Schwangerschaft zur Bildung von Zysten und Vakuolen, die anschließend zu einer tubulären Struktur verschmelzen und sich mit dem Neuralrohr verbinden.

Bevor sich der posteriore Bereich des Neuralrohrs vollständig gebildet hat, finden im anterioren Bereich bereits komplexe, strukturelle Vorgänge statt. Durch aufeinanderfolgende Erweiterungen und Verengungen des Neuralrohrs bilden sich zunächst drei Vesikel, die sogenannten primären Hirnbläschen, aus, die sich anschließend in fünf sekundäre Hirnbläschen entwickeln. Aus diesen

Hirnbläschen entwickelt sich das gesamte Gehirn. Die Wände der Hirnbläschen bestehen zunächst nur aus zwei Schichten, der innen liegenden Ventrikulärzone und der äußeren Marginalzone.

In der Ventrikulärzone befinden sich neurale Stammzellen, die sich aus den Neuroektodermzellen gebildet haben. Dies sind multipotente Stammzellen, die das Potential haben, zu allen neuronalen und glialen Zelltypen zu differenzieren. Um die Anzahl der neuronalen Stammzellen zu erhöhen, teilen sich diese Zellen zunächst symmetrisch, sodass zwei identische Tochterzellen entstehen. Später in der Entwicklung dominiert eine asymmetrische Zellteilung. Dabei entsteht eine Tochterzelle, die in der Ventrikulärzone verbleibt und sich fortwährend teilt, sowie eine Tochterzelle, die entlang der Fortsätze sogenannter Radialgliazellen in Richtung ihres Zielortes migriert und dabei differenziert [57, 58]. Dort angekommen, erfolgt die Vernetzung mit bereits vorhandenen Zellen, sowie die terminale Differenzierung, die bei Neuronen zu der Anlage spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle führt und somit die elektrischen Erregbarkeit ermöglicht [59].

Die enorme Komplexität der Nervensystementwicklung erschwert die Untersuchung potentieller Effekte einer *in utero* Exposition mit ionisierender Strahlung. Um die Bestrahlungseffekte auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Modellsystem entwickelt, das zumindest Teilaspekte einer *in utero* Exposition widerspiegelt. Dafür wurden humane embryonale Stammzellen mit ionisierender Strahlung exponiert, die überlebenden Zellen zunächst zu neuronalen Stammzellen und anschließend in 3D-Neurosphären zu Neuronen differenziert. Anschließend wurde das elektrische Aktivitätsmuster dieser Neurosphären analysiert und mit dem von unbestrahlten Kulturen verglichen.

2.4. Physiologie der Neurone

Die Kommunikation neuronaler Zellen erfolgt durch die Ausbildung elektrischer Impulse, die als Aktionspotentiale bezeichnet werden. Die Ausbildung dieser Aktionspotentiale, sowie ihre besonderen Eigenschaften, beruhen auf dem Vorhandensein von spannungsgesteuerten Ionenkanälen in der Plasmamembran der Zelle. Diese Kanäle sind selektiv für bestimmte Ionenarten und ihr Öffnungsverhalten ist abhängig von dem aktuell vorherrschenden Membranpotential.

Auch im unerregten Zustand ist die Zellmembran für bestimmte Ionen, insbesondere für Kalium-Ionen, selektiv permeabel. Aufgrund dieser selektiven Permeabilität, sowie der ungleichmäßigen Ionenzusammensetzung im Cytosol und der Extrazellulärflüssigkeit, entsteht eine Potentialdifferenz über der Zellmembran. Diese Potentialdifferenz im unerregten Zustand von Neuronen, wird auch als Ruhepotential bezeichnet und liegt im Durchschnitt etwa bei -65 mV. Die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials ist ein aktiver Prozess, der hauptsächlich durch die Aktivität von Ionenpumpen gesteuert wird. Wird die Membran am Axonhügel durch einen exzitatorischen Stimulus über einen bestimmten Schwellwert depolarisiert, so kommt es zur Ausbildung eines Aktionspotentials. Dieses wird häufig auch

als Spike bezeichnet. Bei diesem Vorgang handelt es sich um eine kurzfristige Umkehrung des Membranpotentials in der Form, dass das Cytosol im Verhältnis zur extrazellulären Flüssigkeit positiv geladen ist. Die Vorgänge in der Zellmembran, die der Ausbildung eines Aktionspotentials zugrunde liegen, sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Wird der Schwellwert, der bei etwa -55 mV liegt, nach der zeitlichen und räumlichen Summation aller eingehenden erregenden (exzitatorisch) und hemmenden (inhibitorisch) postsynaptischen Potentiale überschritten, öffnen sich die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle. Natrium-Ionen fließen nun entlang ihres Konzentrationsgradienten in das Cytosol der Zelle hinein und depolarisieren dadurch das Membranpotential auf etwa 30 mV. Diese erste Phase wird auch als Aufstrich bezeichnet. Die Natrium-Kanäle bleiben nur für einen Zeitraum von etwa 1 ms geöffnet und schließen sich dann wieder. Gleichzeitig kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen. Dies hat zur Folge, dass Kalium-Ionen durch den osmotischen Druck und durch die Potentialdifferenz aus dem Cytosol in die extrazelluläre Flüssigkeit getrieben werden, so dass das Membranpotential wieder in den negativen Bereich abfällt und sich dem Ruhepotential annähert. Es wird repolarisiert. Das Membranpotential kann kurzfristig sogar negativer werden, als das Ruhepotential. Dieser Effekt wird auch als Hyperpolarisation bezeichnet. Die Kalium-Kanäle schließen sich nach einem Zeitraum von etwa 5 – 10 ms und das Membranpotential wird durch die Aktivität der Natrium-Kalium-Pumpen wieder auf das Ruhepotential ausgeglichen.

Die Ausbildung eines Aktionspotentials findet am initialen Axonsegment, dem Axonhügel, statt. Die Weiterleitung des Signals erfolgt ohne eine Änderung der Amplitude über die gesamte Länge des Axons, bis hin zur synaptischen Endigung. Im Falle einer chemischen Synapse, bedingt das Aktionspotential die Freisetzung spezifischer Neurotransmitter und somit die Übertragung des Signals auf die postsynaptische Membran. Die Weiterleitungsgeschwindigkeit von Aktionspotentialen ist abhängig vom Durchmesser des Axons, sowie von seiner Myelinisierung. Bei dünnen, nicht myelinisierten Axonen beträgt die Weiterleitungsgeschwindigkeit etwa 1 m/s, während für myelinisierte Axone die maximale Geschwindigkeit mit 120 m/s angegeben wird [60].

Nachdem ein Aktionspotential generiert wurde, ist die Zelle für etwa 2 ms nicht mehr erregbar, da sich die Na^+ -Kanäle in einem inaktiven Zustand befinden und sich, unabhängig von der Reizstärke, nicht öffnen. Diese Zeit wird als absolute Refraktärzeit bezeichnet. Sie gewährleistet die unidirektionale Weiterleitung des Signals. Im Anschluss an diese Phase folgt die relative Refraktärzeit. Durch die begonnene Repolarisation befinden sich einige Na^+ -Kanäle erneut in einem aktivierbaren Zustand. Bei einer entsprechend hohen Reizstärke können Aktionspotentiale generiert werden, die jedoch eine abgeschwächte Amplitude, sowie eine geringere Depolarisationssteilheit besitzen.

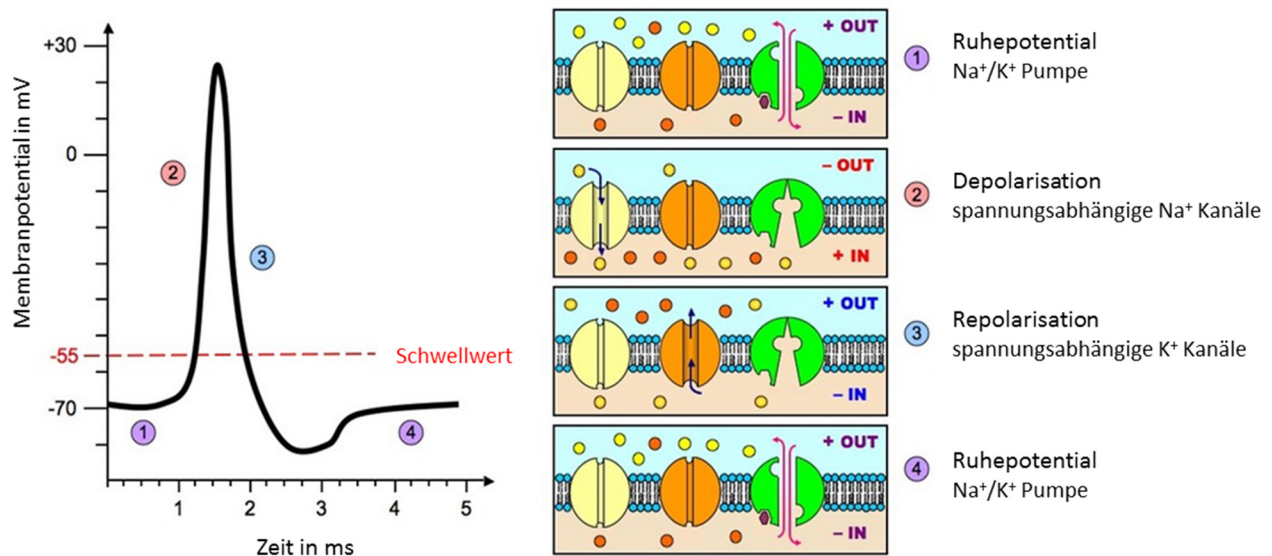


Abbildung 2.3: Vorgänge in der Zellmembran, die der Ausbildung eines Aktionspotentials zugrunde liegen. Das charakteristische neuronale Aktionspotential kann in 4 Phasen unterteilt werden. Das Ruhepotential beträgt etwa -65 mV und wird durch die Aktivität der Natrium/Kalium-Ionenpumpen aufrechterhalten (Phase 1). Wird der Schwellwert durch einen exzitatorischen Stimulus überschritten, öffnen sich schlagartig spannungsabhängige Natrium-Kanäle, so dass Natrium-Ionen in das Cytosol fließen und dadurch das Membranpotential auf etwa 30 mV depolarisieren (Phase 2). Die Natrium-Kanäle schließen sich wieder und spannungsabhängige Kalium-Kanäle öffnen sich, so dass Kalium-Ionen aus dem Cytosol fließen und das Membranpotential erneut einen negativen Wert annimmt (Phase 3). Nachdem sich auch die Kalium-Kanäle wieder geschlossen haben, wird das Membranpotential durch die Aktivität der Natrium/Kalium-Ionenpumpen wieder auf das Ruhepotential ausgeglichen (Phase 4). Modifizierte Abbildung nach [61].

Überdauert ein exzitatorischer Stimulus die Refraktärzeit, werden weitere Aktionspotentiale generiert. Solch hochfrequente Abfolgen von Aktionspotentialen werden als Bursts bezeichnet. Im Gegensatz zu einzeln auftretenden Spikes, die nach der synaptischen Übertragung häufig als unterschwellige Depolarisation neutralisiert werden, erfolgt die Weiterleitung der Bursts zuverlässig von der prä- zur postsynaptischen Membran [62]. Aufgrund der komplexen neuronalen Verbindungen und synaptischen Verknüpfungen, breitet sich ein spontan generierter Burst häufig über das gesamte Netzwerk aus und wird als synchrones Burstereignis (SBE) bezeichnet.

SBEs spielen eine wichtige Rolle in der Etablierung neuronaler Verbindungen und werden in diversen Hirnarealen beobachtet [63-65]. Auch in *in vitro* Zellkulturen stellt die Generierung von SBEs ein generelles Charakteristika dar, welches bereits in vielen 2D-Zellmodellen beschrieben wurde [66-68]. Im Gegensatz zu der Situation *in vivo*, bleibt dieses Aktivitätsmuster in Zellkulturen jedoch während der gesamten Kultivierungszeit erhalten. Dieses kontinuierliche Auftreten von SBEs in *in vitro* Kulturen könnte als ein Stillstand in der Netzwerkentwicklung, aufgrund des fehlenden Inputs anderer Hirnareale, angesehen werden [66, 69]. Ähnliche Aktivitätsmuster konnten auch *in vivo* beobachtet werden, wie beispielsweise bei Abwesenheit afferenter Stimuli oder bei epileptischen Krampfanfällen [70-72].

2.5. Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung

Die räumliche Ausbreitung von Energie in Form von Wellen oder Teilchen wird als Strahlung bezeichnet. Wenn diese Strahlung genügend Energie besitzt, um aus den Atomen bestrahlter Materie Elektronen zu entfernen, handelt es sich um ionisierende Strahlung. Dieses Ereignis wird auch als Ionisation bezeichnet. Ein quantitatives Maß, für die von der Strahlung beim Durchgang durch Materie deponierte Energie, stellt die Energiedosis dar. Diese wird in der Regel in Gray (Gy) angegeben und beschreibt die Energie in Joule, die pro Kilogramm Materie absorbiert wird.

$$\text{Energiedosis: } D = \frac{E}{m} ; [D] = \text{Gy} = \frac{\text{J}}{\text{kg}}$$

Ionisierende Strahlung kann in Form elektromagnetischer Wellen oder als Teilchenstrahlung auftreten. Zu den elektromagnetischen Wellen zählen Röntgen- und Gamma-Strahlen, sowie kurzwellige UV-Strahlen. Dabei handelt es sich um Photonenstrahlungen, die dünn-ionisierend wirken. Dies bedeutet, dass die Energieübertragung gleichmäßig über die bestrahlte Zielmaterie erfolgt und an jeder Stelle eine mittlere Energiemenge deponiert wird (Abbildung 2.4A). Photonenstrahlen ionisieren die Atome in der Zielmaterie über den Photoeffekt, den Compton-Effekt und bei hohen Energien über Paarbildung [73]. Bei dem Photoeffekt interagiert das Photon mit einem Elektron aus der inneren Schale eines Atoms. Dabei absorbiert das Elektron die gesamte Energie des Photons und wird aus der Schale heraus geschlagen. Das nun als Sekundärelektron bezeichnete Elektron kann anschließend weitere Ionisationsereignisse in der Materie auslösen. Bei dem Compton-Effekt kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem einfallenden Photon und einem Elektron aus der äußeren Atomhülle. Bei dieser Interaktion wird die Energie des Photons nicht vollständig, sondern nur teilweise auf das Elektron übertragen. Dadurch werden das Photon und das entstandene Sekundärelektron gestreut und können mit niedrigerer Energie weitere Ionisationsereignisse auslösen. Bei der Paarbildung wird ein Photon im elektrischen Feld des Atomkerns in ein Elektron und ein Positron umgewandelt.

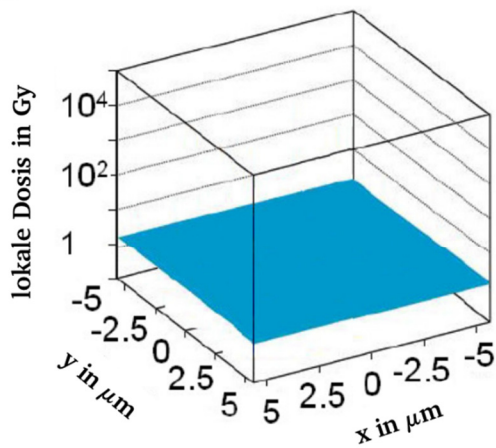
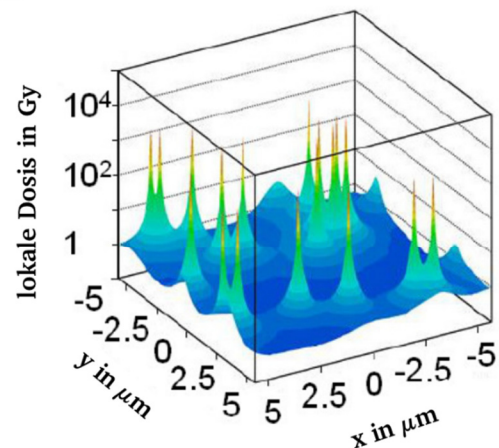
A**Röntgenstrahlung****B****Kohlenstoff-Ionen**
(15 MeV/u)

Abbildung 2.4: Die Dosisverteilung bei einer Röntgenbestrahlung im Vergleich zu einer Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen bei einer gleichen mittleren Dosis von 2 Gy. Bei einer Röntgenbestrahlung erfolgt die Dosisdeposition gleichmäßig über die bestrahlte Zielmaterie (A). Im Gegensatz dazu weisen Kohlenstoff-Ionen eine lokal konzentrierte Deposition der Dosis auf (B). Modifizierte Abbildung nach [74].

Alle Strahlungen elektrisch geladener Teilchen, wie beispielsweise Alpha-, Beta-, Protonen- und Schwerionenstrahlung, werden der Teilchenstrahlung zugeordnet. Dabei handelt es sich um dicht ionisierende Strahlung. Dies bedeutet, dass die Energieübertragung nicht gleichmäßig über die bestrahlte Zielmaterie erfolgt, sondern dass lokal hohe Strahlendosen verteilt über die Bestrahlungsfläche deponiert werden.

Nach dem Eindringen des Ionenstrahls in die Materie wird durch Coulomb-Wechselwirkungen eine dichte Spur von Ionisationsereignissen entlang der Trajektorie des Ions, die sogenannte Teilchenspur, erzeugt [75]. Bei diesem Prozess werden Sekundärelektronen aus der Atomhülle emittiert. Diese besitzen im Vergleich zu den Primärteilchen eine geringere Energie und Reichweite, so dass eine hohe lokale Dosisdeposition entlang der Teilchenspur entsteht. Die Dichte der Ionisationsereignisse ist abhängig von der Energie der Primärteilchen, sowie ihrer Geschwindigkeit. Bei hoher Energie des Primärteilchens finden pro Wegstrecke weniger Ionisationsereignisse statt, als bei einer niedrigen Energie. Abbildung 2.5 veranschaulicht dies am Beispiel eines Kohlenstoff-Ions bei unterschiedlichen Energien. Dies hat zur Folge, dass die Dichte der Ionisationsereignisse am Anfang der Teilchenspur, wenn die Ionen in die Materie eindringen, sehr gering ist. Mit zunehmender Eindringtiefe verlieren sie jedoch kontinuierlich an Energie und Geschwindigkeit, so dass die Dichte der Ionisationsereignisse zunimmt. Die Menge der Energie, die ein ionisierendes Teilchen pro Wegstrecke an die durchdrungene Materie abgibt, wird als linearer Energietransfer (LET) bezeichnet und in der Einheit $\text{keV}/\mu\text{m}$ angegeben.

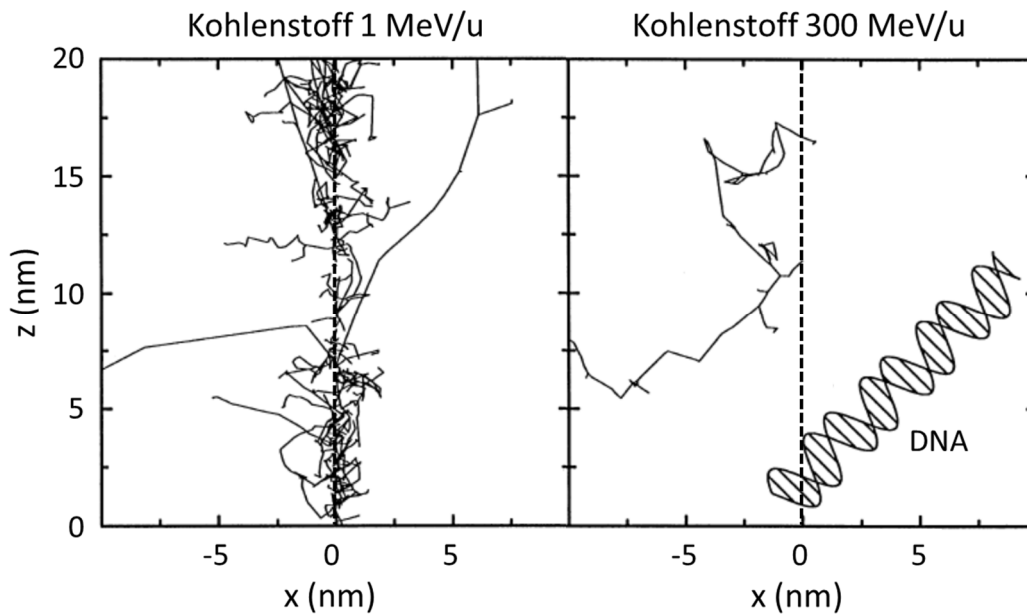


Abbildung 2.5: Die Dichte der Ionisationsereignisse ist abhängig von der Energie der Kohlenstoff-Ionen. Bei niedriger Energie (1 MeV/u, linke Seite) finden mehr Ionisationsereignisse statt, als bei hoher Energie (300 MeV/u, rechte Seite). Die Teilchenspur der Kohlenstoff-Ionen ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Das DNA-Molekül auf der rechten Seite dient dem Größenvergleich. Modifizierte Abbildung nach [76].

Werden die Ionen an ihrer maximalen Eindringtiefe in der Materie vollständig abgestoppt, wird das Maximum der deponierten Dosis, der sogenannte *Bragg-Peak*, erreicht. Das typische Tiefen-Dosis-Profil der Ionenstrahlung ist in Abbildung 2.6 dargestellt und wird mit demjenigen von Röntgenstrahlung verglichen. Beim Einsatz von Schwerionenstrahlung in der Tumorthherapie kommt es jedoch häufig vor, dass der Durchmesser des *Bragg-Peaks* zu gering ist, um den kompletten Tumor abzudecken. In dem Fall wird der *Bragg-Peak* zu einem sogenannten *spread out bragg-peak* (SOBP) ausgeweitet. Dies erfolgt durch Variationen der Eingangsenergien. Durch die Addition der Einzeldosen wird eine homogene Dosisverteilung über das gesamte Volumen des Tumors gewährleistet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen auf die Entwicklung neuronaler Netzwerke untersucht. Die Auswirkung einer Exposition mit Röntgenstrahlung ist von Interesse, da die Röntgendiagnostik die häufigste Anwendung ionisierender Strahlung in der Medizin darstellt. Die Anzahl an schwangeren Frauen, bei denen ein medizinisches Bildgebungsverfahren angewendet werden musste, ist in den Jahren 1997 bis 2006 um 121 % angestiegen [77]. Insbesondere bei Untersuchungen im Bauch- und Beckenbereich ist der Embryo einer nicht zu vernachlässigbaren Strahlendosis ausgesetzt. Die Experimente mit Röntgenstrahlung an den kortikalen Neuronen der Ratte wurden an der TU-Darmstadt und die der Neurosphären an der GSI durchgeführt. Die Untersuchung der Folgen einer Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen ist von Interesse, da diese in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Aufgrund des Tiefen-Dosis-Profils können auch

tiefliegende Tumore gezielt mit hohen Dosen bestrahlt werde, ohne das umliegende Gewebe schwerwiegend zu beschädigen [74].

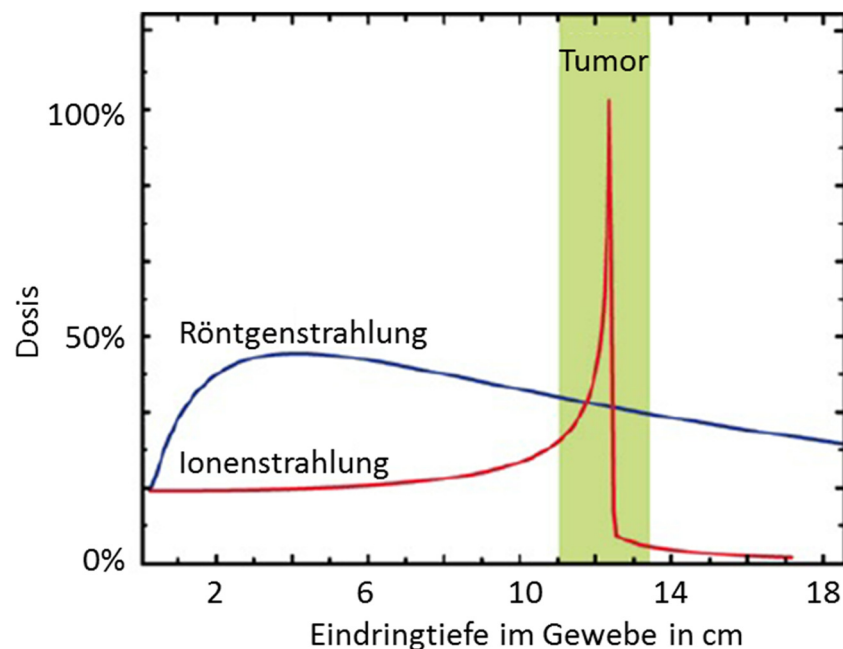


Abbildung 2.6: Eindringtiefe von Röntgenstrahlung und Ionenstrahlung im Gewebe. Die Strahlendosis von Röntgenstrahlen erreicht bereits nach einer Eindringtiefe von einigen cm ihr Maximum und nimmt dann exponentiell ab. Im Gegensatz dazu haben Ionenstrahlen eine definierte Reichweite, wobei ihre Energiedeposition durch eine niedrige Dosis im Eintrittsbereich, sowie durch eine maximale Strahlendosis am Ende der Reichweite charakterisiert ist. Diese Eigenschaft der Ionenstrahlung bietet einen wesentlichen Vorteil für die Strahlentherapie von Tumoren, die sich tief im Gewebe befinden. Der grün markierte Bereich stellt eine mögliche Position eines Tumors im Gewebe dar. Modifizierte Abbildung nach [78].

2.6. Strahlenbelastung des Menschen

Jeder Mensch ist kontinuierlich einer Exposition mit ionisierender Strahlung ausgesetzt. Diese natürliche Hintergrundstrahlung setzt sich aus der kosmischen und terrestrischen Komponente, sowie aus der Exposition durch die Aufnahme natürlicher radioaktiver Stoffe in den Körper zusammen. Die durchschnittliche effektive Dosis durch die natürliche Strahlenexposition, für eine in Deutschland lebende Person pro Jahr, beträgt etwa 2,1 mSv [79]. Neben der natürlichen Hintergrundstrahlung sind Menschen auch einer zivilisatorisch bedingten Strahlenexposition ausgesetzt. Die mittlere effektive Dosis pro Person und Jahr beträgt hierbei etwa 1,9 mSv [79]. Der größte Beitrag wird bei der zivilisatorisch bedingten Strahlenexposition durch die Anwendung radioaktiver Stoffe und ionisierender Strahlung in der Medizin verursacht. Die Exposition mit ionisierender Strahlung ist unerlässlich in der medizinischen Diagnostik (Röntgenaufnahmen, Computertomographie) und Therapie (Strahlentherapie). Sie kann jedoch schwerwiegende Folgen haben. Insbesondere eine *in utero* Bestrahlung bei schwangeren Frauen ist problematisch, da der sich entwickelnde Embryo besonders strahlenempfindlich ist. Die

Konsequenzen einer *in utero* Bestrahlung sind abhängig von der Strahlendosis, sowie dem Entwicklungsstadium des Embryos zum Zeitpunkt der Bestrahlung und reichen von Wachstumsstörungen, Mikrozephalie, mentaler Beeinträchtigung, Missbildung der Organe, Krebserkrankung, bis hin zum pränatalen Tod des Embryos [77]. Erfolgt die Bestrahlung während der Präimplantationsphase (bis zu 2 Wochen nach der Empfängnis), so ist das Hauptrisiko der frühe Embryonaltod. Dies wurde ab einer applizierten Strahlendosis von 0,1 Gy beobachtet [77]. Mit fortschreitender Entwicklung des Embryos erhöht sich dieser Grenzwert. Nach einer Bestrahlung während der Organbildungsperiode (2-7 Wochen nach Empfängnis) steigen die Risiken für Wachstumsstörungen und Missbildungen [77]. Erfolgt die Bestrahlung hingegen während der frühen Fetalperiode (8-15 Wochen nach Empfängnis), steigen die Risiken einer mentalen Beeinträchtigung [77]. Epidemiologische Studien an Überlebenden der Atombombenabwürfe in Japan zeigten, dass sich der Intelligenzquotient (IQ) ab einer Exposition mit 0,1 Gy proportional zur Strahlendosis verringert [77]. Des Weiteren ist eine *in utero* Exposition auch hinsichtlich erhöhter Krebsraten kritisch zu betrachten. In der Literatur liegen hierzu jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor. Die sogenannte Oxford-Studie zeigte ein vermehrtes Auftreten von Leukämie und malignen Tumoren bei Kindern bis zum Alter von 10 Jahren, die *in utero* eine Strahlenexposition aufgrund einer Röntgenuntersuchung der Mutter erhalten haben [80]. Epidemiologische Studien an Kindern, die bei den Atombombenabwürfen in Hiroshima und Nagasaki *in utero* exponiert wurden, zeigten hingegen kein vermehrtes Auftreten maligner Tumore [81].

Um gesundheitliche Schädigungen durch den Einsatz ionisierender Strahlung zu vermeiden, legen die Strahlenschutzverordnung und die Röntgenverordnung Grenzwerte und Schutzmaßnahmen fest. Bei schwangeren Frauen beträgt der Grenzwert für das ungeborene Kind gemäß § 55 Strahlenschutzverordnung 1 mSv vom Zeitpunkt der Bekanntgabe bis zum Ende der Schwangerschaft [82]. Diese Schutzmaßnahmen können jedoch nur dann effektiv sein, wenn die Schwangerschaft bereits bekannt ist. Insbesondere in der frühen Phase der Schwangerschaft ist dies jedoch nicht immer der Fall. So wird beispielsweise 2010 der Fallbericht einer Frau veröffentlicht, die aufgrund eines Chordoms der Schädelbasis einer Strahlentherapie mit Kohlenstoff-Ionen unterzogen wurde [83]. Der Behandlungsplan sah eine Gesamtstrahlendosis von 60 GyE (photonenäquivalente Dosis) vor, die in 20 fraktionierten Bestrahlungen appliziert werden sollte. Nach der sechsten fraktionierten Bestrahlung stellte sich jedoch heraus, dass die Patientin schwanger war. Durch eine Simulation mithilfe eines Phantoms aus Wasser, wurde die applizierte Strahlendosis im Uterus als gering eingestuft. Die zusätzliche Überprüfung mittels aktiver und passiver Dosimetrie ergab eine Gesamtstrahlenbelastung im Beckenbereich von 82 μ Sv nach 20 fraktionierten Bestrahlungen. Die applizierte Strahlendosis im Uterus wurde auf < 0,2 mSv geschätzt. Dieser Wert liegt unterhalb der natürlichen Strahlenbelastung, sodass

die Strahlentherapie fortgesetzt werden konnte. Die Patientin brachte ein gesundes Kind zur Welt, das auch im Alter von einem Jahr keine kognitiven und gesundheitlichen Beeinträchtigungen aufwies.

Dieser Fall zeigt wie wichtig es ist, die Wirkung ionisierender Strahlung auf die pränatale Entwicklung des Menschen zu untersuchen, da eine Exposition nicht immer verhindert werden kann. Um eine fundierte Risikoabschätzung durchführen zu können ist es zwingend erforderlich, die durch ionisierende Strahlung induzierten Mechanismen, sowie die daraus resultierenden Schädigungen genauer zu verstehen.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Die Experimente in der hier vorliegenden Arbeit wurden mit zwei unterschiedlichen neuronalen Zellkulturmodellen durchgeführt. Bei dem ersten handelt es sich um kortikale Neurone, die aus 18 Tage alten Rattenembryonen isoliert wurden. Diese Zellen wurden kommerziell erworben (siehe Tabelle 7), in flüssigem Stickstoff gelagert und nach dem Auftauen umgehend auf die MEA Chips oder *Coverslips* (CS) ausgesät. Bei dem zweiten Zellkulturmodell handelt es sich um dreidimensionale Neurosphären, die aus humanen embryonalen Stammzellen differenziert wurden. Die Kultivierung der Stammzellen, sowie ihre Differenzierung zu Neurosphären, wurden überwiegend von Dr. Onetsine Arrizabalaga de Mingo an der GSI, im Rahmen einer Kooperation mit dem Verbundprojekt „Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden (Neurorad)“, durchgeführt. In den Abschnitten 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3 wird die Kultivierung von hESC, die Differenzierung zu NSC, sowie die Herstellung der NS erläutert.

3.1.1. Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen

In dieser Arbeit wurden die hESC der Linie WA09 (H9) der Firma Wicell (Wicell Research Institute, Madison, WI, USA) verwendet. Das Auftauen der Zellen wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 5 %CO₂) auf einem *feeder layer* aus teilungsinaktivierten embryonalen Maus Fibroblasten (MEF) in H9-Medium (siehe Tabelle 6). Die manuelle Passage der Zellen wurde einmal pro Woche durchgeführt. Detailliertere Informationen bezüglich der hESC Kultivierung und Passage, sowie über die Präparation der MEFs sind folgenden Quellen zu entnehmen [84, 85].

3.1.2. Differenzierung von embryonalen zu neuralen Stammzellen

Eine Woche vor Beginn der Differenzierung der hESC zu NSC wurden die MEFs aus der Kultur entfernt. Hierfür wurden 12.5 cm² Zellkulturflaschen mit Geltrex (Gibco, ThermoFisher Scientific) beschichtet und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die hESC manuell in die Zellkulturflaschen überführt. Das Kultivierungsmedium (MEF-konditioniertes Medium ergänzt mit 4 ng/ml bFGF) wurde täglich ausgewechselt. Um den Differenzierungsprozess mit einer definierten Zellanzahl zu beginnen, wurden die hESC einen Tag vor Beginn der Differenzierung mit ReLeSR™ (StemCell Technologies) passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, mit ReLeSR™ bedeckt und für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die gelösten Zellaggregate wurden auf eine mit Geltrex beschichtete Kulturplatte in MEF-konditionierten Medium mit 4 ng/ml bFGF und 5 µM *Rock Inhibitor* (Tocris) ausgesät (2-3 x 10⁴ Zellen/cm²). Am darauffolgenden Tag wurde die neurale Differenzierung eingeleitet, indem das Kultivierungsmedium durch *Gibco™ PSC neural induction medium* (NIM, ThermoFisher Scientific) ersetzt wurde. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

3.1.3. Herstellung von Neurosphären

Sieben Tage nach Beginn der Differenzierung, wurden die NSC zweimal mit PBS gewaschen und mit Accutase enzymatisch zu einer Einzelzell-Suspension dissoziiert. Hierfür wurden die Zellen für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 10⁵ Zellen/ml in NS-B27 Medium ergänzt mit 20 µM Rock Inhibitor in *ultra-low attachment 6 well plates* (Corning) ausgesät. Im Laufe der ersten Woche reaggregierten die Zellen und bildeten dreidimensionale NS aus. Diese verblieben 18 Tage lang in der Suspensionskultur, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Zweimal wöchentlich erfolgte ein halber Medienwechsel.

Zur Qualitätskontrolle wurde der Durchmesser der NS an Tag 14 bestimmt. Hierfür wurden mikroskopische Aufnahmen der NS angefertigt. Die Fläche der NS, sowie ihr Durchmesser wurden anschließend durch die *NIS-Elements Documentation software*TM berechnet.

3.2. Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemische Charakterisierung der kortikalen Neurone aus der Ratte wurden diese auf CS kultiviert und an Tag 16 *in vitro* (*days in vitro*, *div*) für 10 Minuten in 4 % PFA/PBS fixiert.

Anschließend wurden die Präparate mit einem Fettstift eingerahmt, sodass die aufgetragenen Lösungen nicht vom Objektträger abfließen konnten. Der primäre Antikörper wurde in Blocklösung (5 % BSA, 0,1 % Triton X-100 in PBS) verdünnt und auf die fixierten Proben pipettiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Proben dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blocklösung verdünnt. Die eingesetzten Verdünnungen sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Inkubationszeit des sekundären Antikörpers betrug 90 Minuten und erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten erfolgte die Zellkernfärbung der DNA mittels DAPI oder Hoechst. Hierfür wurde eine DAPI (0,1 µg/ml) oder Hoechst (5 µg/ml) Färbelösung auf die Proben pipettiert und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Proben einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die CS mit Kaiser's Glyceringelatine auf Objektträger gelegt und der Rand mit Nagellack abgedichtet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Die Analyse der strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche, sowie ihre Reparatur erfolgten durch die Markierung der phosphorylierten Form des Histons H2AX (γH2AX). Hierfür wurden die kortikalen Rattenneurone auf CS kultiviert, an 16 *div* einer Exposition mit 1 Gy oder 2 Gy Röntgenstrahlung ausgesetzt und anschließend 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden nach Bestrahlung fixiert.

Die für die immunhistochemische Charakterisierung vorgesehenen NS wurden ebenfalls auf CS kultiviert und nach 18 Tagen für 20 Minuten in 4 % PFA/PBS fixiert. Das Protokoll für die anschließende Färbung entsprach demjenigen der kortikalen Rattenneurone.

3.3. Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden *Arrays*

3.3.1. Beschichtung der MEA Chips

Um den Zellen auf den MEA Chips eine optimale Adhäsion zu ermöglichen, wurden diese vor der Zellaussaat mit Polyethylenimin (PEI) und Laminin beschichtet. Hierzu wurde das PEI (0,1 % in Borsäurepuffer) auf die zu beschichtende Oberfläche pipettiert und anschließend für 1 Stunde bei RT inkubiert. Um das ungebundene PEI zu entfernen, wurden die Chips viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und zum Trocknen in eine Sterilbank gestellt. Als nächstes erfolgte die Beschichtung mit Laminin (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS). Hierzu wurde das Protein auf die Oberfläche pipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Laminin wieder abgezogen und die Zellaussaat ohne vorheriges Waschen durchgeführt.

3.3.2. Aussaat kortikaler Rattenneurone auf die MEA Chips

Die kortikalen Neurone aus der Ratte wurden für die elektrophysiologischen Untersuchungen auf MEA Chips kultiviert, die zuvor wie unter Punkte 3.3.1 beschrieben, beschichtet wurden. Die Zellaussaat erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls. Zunächst wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, für 3 Minuten bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 3 ml vorgewärmtes PNGM Medium (siehe Tabelle 6) tropfenweise hinzugefügt, sodass sich eine Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ einstellte. Nach zweimaligem Invertieren des Röhrchens erfolgt die Zellaussaat auf die MEA Chips.

Hierzu wurden 125 μl der Zellsuspension direkt auf das Elektrodenfeld der MEA Chips pipettiert. Dies entspricht einer Zelldichte von 125.000 Zellen. Anschließend wurden die MEA Chips in Petrischalen aufbewahrt und für 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Um eine Evaporation zu vermeiden, wurde ein mit sterilem Wasser angefeuchtetes Tuch in jede Petrischale hinzugegeben. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Kavitäten der MEA Chips vorsichtig mit 1,5 ml Medium befüllt. Danach wurden die Zellen für 3 Tage bei 37 °C inkubiert, bevor der erste Medienwechsel durchgeführt wurde. Anschließend wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt. Bei sämtlichen Medienwechseln wurde lediglich die Hälfte des Mediums ausgetauscht.

Die ersten Messungen wurden ab 7 *div* durchgeführt. Um mögliche Beeinflussungen des Medienwechsels auf die Aktivität der Zellkulturen zu vermeiden, erfolgte der Medienwechsel erst nach Vollendung der Messungen. Um des Weiteren tageszeitabhängige Schwankungen der Netzwerkaktivität auszuschließen, wurden die Messungen innerhalb eines Versuches stets zur selben Uhrzeit durchgeführt.

3.3.3. Aussaat der Neurosphären auf die MEA Chips

Die Beschichtung der MEA Chips erfolgte gemäß des in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Protokolls. Anschließend wurde die Kavität des MEA Chips mit 500 μl NS-B27 Medium (siehe Tabelle 6) gefüllt. In das Medium wurde eine einzelne Neurosphäre gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde diese auf dem Elektrodenfeld positioniert und der MEA Chip anschließend behutsam in den Inkubator gestellt. Am nachfolgenden Tag wurde die Kavität vollständig mit Medium gefüllt und die ersten Messungen durchgeführt. Die Hälfte des Mediums wurde täglich nach Vollendung der Messungen ausgetauscht. Um tageszeitabhängige Schwankungen der Netzwerkaktivität auszuschließen, erfolgten die Messungen innerhalb eines Versuches stets zur selben Uhrzeit.

Zur Qualitätskontrolle wurde am ersten Tag nach der Aussaat die Fläche der auf dem Substrat angewachsenen NS bestimmt. Hierfür wurden mikroskopische Aufnahmen der NS angefertigt und die Fläche mithilfe der Software *ImageJ* bestimmt. Dabei wurden die NS manuell markiert und die darin enthaltene Fläche in mm^2 ermittelt.

3.3.4. Ableitung extrazellulärer Signale mittels MEA Chips

Die in dieser Arbeit verwendeten MEA Chips wurden von der Firma *Multichannel Systems* (Multichannel Systems MCS GmbH, Reutlingen) bezogen. Sie besitzen Titannitrid-Mikroelektroden, die zentral in einem 8 x 8 Array angeordnet sind und einen Durchmesser von 30 μm besitzen. Dabei handelt es sich um 59 Mess- und um 1 Referenzelektrode. Der Abstand zwischen den einzelnen Elektroden beträgt 200 μm . Die Leiterbahnen bestehen aus Titan, verlaufen 500 μm unterhalb des Glassubstrates und verbinden die Elektroden mit Kontaktpads, die entlang der Außenkanten des MEA Chips angeordnet sind. Das Elektrodenfeld ist von einem Glasring umgeben, der die Zugabe von 1,7 ml Kulturmedium und somit die Kultivierung von Zellen auf dem Elektrodenfeld ermöglicht (Abbildung 3.1).

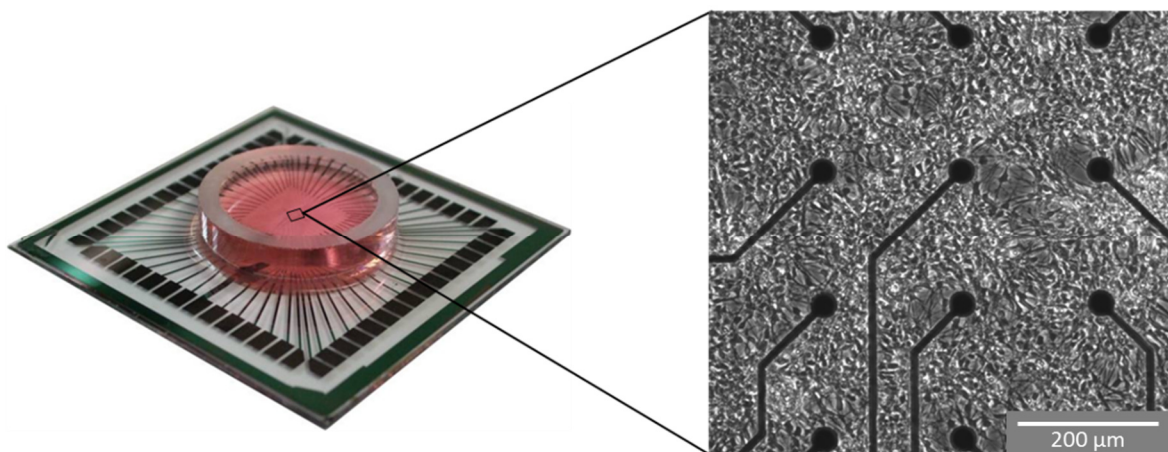


Abbildung 3.1: Kultivierung kortikaler Rattenneurone auf MEA-Chips. MEA Chip von *Multichannel systems*. Entlang der Außenkante befinden sich 60 Kontaktpads, die durch Leiterbahnen mit den 60 Elektroden innerhalb der Kavität verbunden sind. Die Elektroden sind in einer 8x8 Konfiguration angeordnet, besitzen einen Durchmesser von 30 μm sowie einen Interelektrodenabstand von 200 μm . Die neuronalen Zellen wurden direkt auf dem Elektroden Array kultiviert.

Für die Ableitung der elektrophysiologischen Signale wurden die MEA Chips in den Messkopf des Messsystems eingespannt. In diesem ist eine Heizplatte integriert, die während der Messungen eine konstante Temperatur von 37 °C ermöglichte. Im Deckel des Messkopfes befinden sich Federkontakte, die die Kontaktpads des MEA Chips nach dessen Einspannung kontaktieren und die neuronalen Signale über einen Vorverstärker (MEA 1060, Multichannel Systems, Reutlingen), eine Platine und eine PC-Einsteckkarte (PCI 6255, National Instruments Germany GmbH, München) in einer Labview™-Software darstellt [86, 87]. Der Aufbau des MEA Messsystems im BioMEMS Lab der Hochschule Aschaffenburg ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Messungen der elektrophysiologischen Signale erfolgten für eine Minute mit einer Abtastrate von 10 kHz.

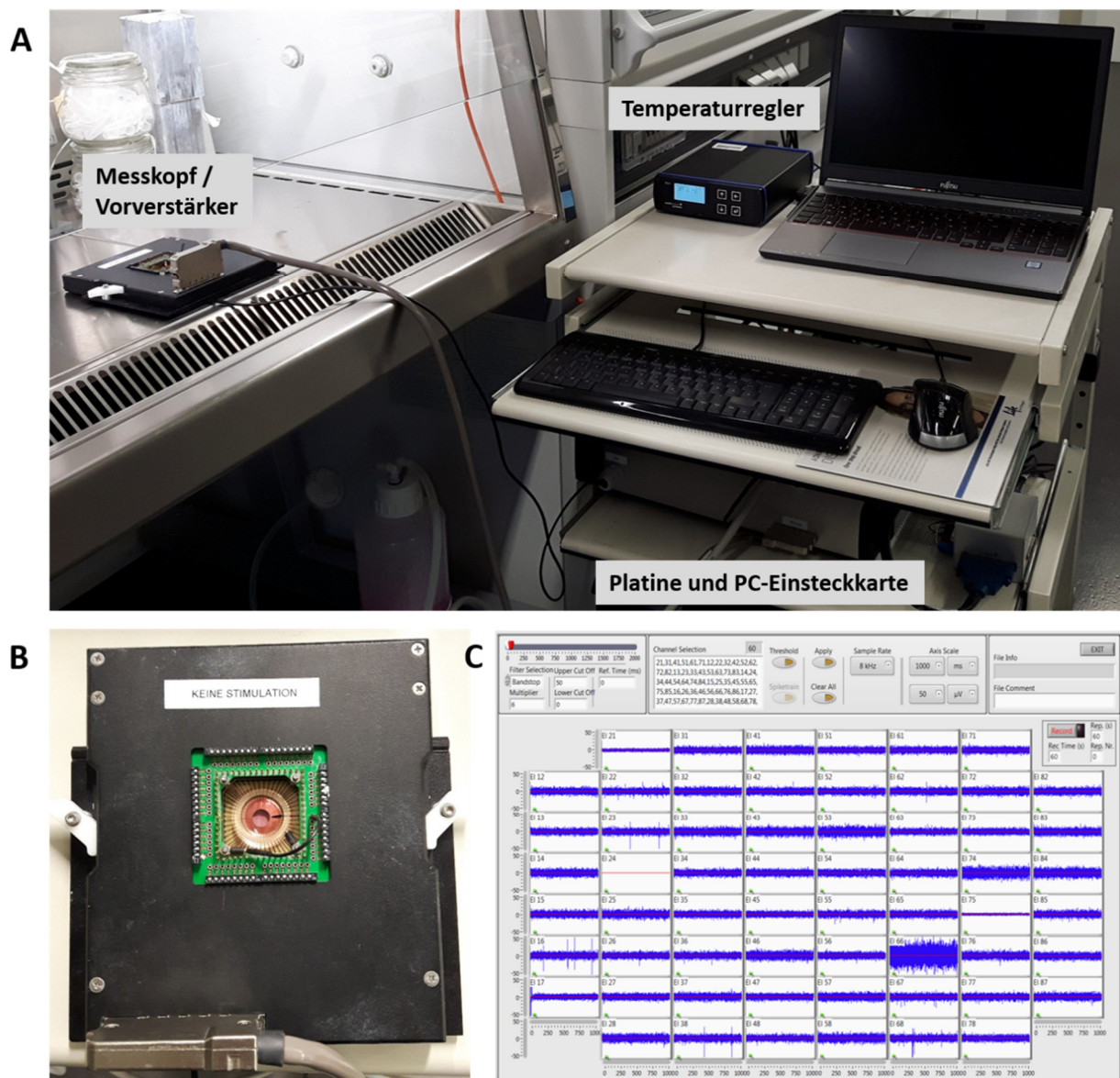


Abbildung 3.2: Aufbau des MEA-Messsystems im BioMEMS Labor an der Hochschule in Aschaffenburg. Die MEA Chips werden in den Messkopf eingespannt und über den Temperaturregler konstant bei 37 °C gehalten. Die neuronalen Signale werden vorverstärkt an die PCI 6255-Platine weitergeleitet (A). Vergrößerte Darstellung des in den Messkopf eingespannten MEA Chips (B). Am Computer werden die neuronalen Signale in der LabView™-Software dargestellt (C).

3.3.5. Analyse der Messdaten mittels *DrCell*

Die mit dem MEA System aufgenommenen Daten wurden anschließend mit der eigens von der BioMEMS-Arbeitsgruppe entwickelten MATLAB™-basierten Software *DrCell* [88] analysiert. Vor jeder Analyse wurden die Messdaten mit einem 50 Hz-Hochpass gefiltert, um eventuell vorhandenes Netzrauschen zu eliminieren. Da sich die neuronalen Signale der kortikalen Rattenneurone deutlich von denjenigen der NS unterscheiden, kamen zwei unterschiedliche Herangehensweisen für die Detektion der Spikes zur Anwendung. Diese werden in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

Analyse der Signale der kortikalen Rattenneuronen

Die Signale der kortikalen Neurone aus der Ratte wiesen ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis auf, so dass die Detektion der Spikes mit einem Algorithmus durchgeführt werden konnte, der ausschließlich auf der Berechnung eines Spannungsschwellwerts (*Threshold*) basiert. Der Ablauf der Spike Detektion ist in Abbildung 3.3 exemplarisch dargestellt. Für die Berechnung des *Thresholds* wurde die *Root-Mean-Square*-Methode (RMS) herangezogen [88]. Dabei wurde auf jeder Elektrode ein Zeitfenster von 2 Sekunden gewählt, in dem lediglich Hintergrundrauschen zu sehen ist. Von diesen Rauschamplituden wurde die Standardabweichung berechnet und mit einem Faktor multipliziert, der vom Anwender bestimmt werden konnte. Bei der Analyse der Signale der kortikalen Rattenneurone wurde ein Faktor von 5 angewendet. Das Resultat entspricht dem *Threshold*-Wert, der von dem Programm für die individuellen Elektroden festgelegt wird. Alternativ konnten *Thresholds* auch manuell vom Anwender korrigiert oder definiert werden. Diejenigen Elektroden, die defekt waren und daher die Ergebnisse verfälschen würden, wurden manuell aus der Auswertung ausgeschlossen.

Nachdem der *Threshold* für jede individuelle Elektrode definiert wurde, erfolgte die Detektion der vorhandenen Spikes. Dabei wurde jedes Messsignal, das den zuvor berechneten *Threshold* überschreitet, als Spike angesehen und das zeitliche Auftreten dieses Signals in Form eines *timestamps* von der Software gespeichert. Die Berechnung der Parameter, die für die Analyse neuronaler Netzwerke von besonderem Interesse sind, erfolgte nun auf Grundlage der zuvor gespeicherten *timestamps*. Hierbei wurden nur die Messungen von Elektroden berücksichtigt, bei denen mindestens sechs Signale pro Minute detektiert wurden [89]. Solche Elektroden werden im Folgenden auch als aktive Elektroden bezeichnet.

Treten die Spikes in einer schnellen zeitlichen Abfolge auf, so wird dies als Burst bezeichnet. Die Anzahl der Spikes, die in einem gewissen Zeitfenster auftreten müssen, damit dieses Ereignis als Burst gewertet werden kann, ist in der Literatur nicht eindeutig definiert. Vielmehr gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Ansätze, die für die Burst Erkennung angewendet werden [69, 90-93]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Burstanalysen basierten auf der Definition von Baker et al. [90]. Laut dieser Definition wird eine Abfolge von Spikes als Burst angesehen, wenn es sich um mindestens 3 Spikes

handelt, deren Interspikeintervalle (ISI) maximal 100 ms betragen. Eine zeitliche Anforderung an die Interburstintervalle (IBI) ist nicht gegeben.

Die analysierten Daten wurden von *DrCell* nun in Form eines Rasterplots dargestellt. Des Weiteren wurden alle relevanten Parameter, wie beispielsweise die Anzahl der Spikes und Bursts, die Höhe der individuellen Amplituden, die durchschnittliche Anzahl der Spikes pro Burst, die durchschnittliche Burstdauer, sowie die durchschnittliche Dauer der IBI errechnet. Die Synchronität der vom Netzwerk generierten Signale wurde optisch beurteilt.

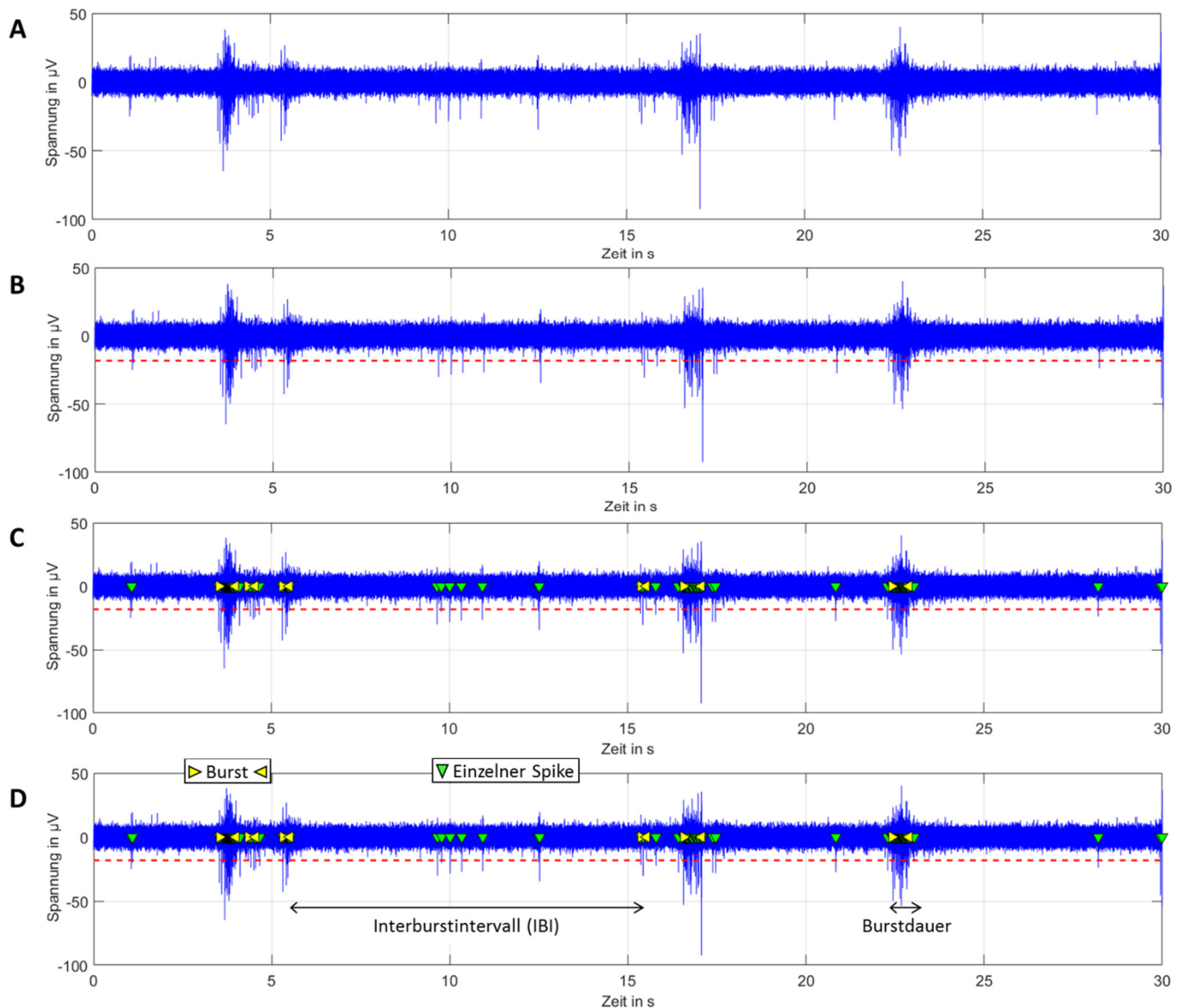


Abbildung 3.3: Spike Detektion durch die Berechnung eines *thresholds* mit der Software *DrCell*. Die Abbildung zeigt beispielhaft den mehrstufigen Prozess der Spike Detektion anhand einer Elektrode. Nach der Aufnahme der elektrophysiologischen Messungen werden die generierten Dateien in die Software *DrCell* importiert (A). Zunächst wird der *threshold* mithilfe der *Root-Mean-Square*-Methode berechnet und durch eine rote, gestrichelte Linie visuell im Messsignal dargestellt (B). Anschließend erfolgt die Spike Detektion. Jedes den *threshold* überschreitende Messsignal wird als Spike angesehen und das zeitliche Auftreten der Spikes in Form eines *timestamp* gespeichert. Jeder detektierte Spike wird im Messsignal mit einem grünen Pfeil und jeder auftretende Burst mit gelben Pfeilen markiert (C). Alle für die Charakterisierung der Netzwerkaktivität relevanten Parameter werden automatisch von *DrCell* berechnet (D).

Analyse der Signale der Neurosphären

Im Gegensatz zu den kortikalen Rattenneuronen, wiesen die Signale der aus hESC differenzierten Neurosphären ein deutlich schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die elektrischen Signale besaßen eine deutlich geringere Signalamplitude, die nur selten Werte $> 50 \mu\text{V}$ aufwiesen. Des Weiteren war das Hintergrundrauschen bei Elektroden, auf denen die dreidimensionale NS direkt auflag, signifikant höher, verglichen mit Elektroden, auf denen ein *Monolayer* an Zellen kultiviert wurde. Um diese Problematik zu verdeutlichen, ist in Abbildung 3.4A eine repräsentative Messung an einer einzelnen Elektrode gezeigt. Die Anwendung eines Algorithmus, der ausschließlich auf der Berechnung eines *thresholds* basiert, ist in diesem Fall nur bedingt geeignet. Um die Spikes detektieren zu können, müsste der *threshold* sehr nahe an das Hintergrundrauschen positioniert werden. Da bei diesem Detektionsverfahren jedoch lediglich die Höhe der Amplitude und nicht die Form des Messsignals berücksichtigt wird, würden mit dieser Methode viele falsch-positive Signale detektiert und das Ergebnis somit verfälscht werden. Um dies zu vermeiden, wurde das üblicherweise verwendete Schwellwertverfahren um einen zusätzlichen Evaluationsschritt mit dem SWTTEO Algorithmus [94] erweitert. Dieses Verfahren wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stark an der Hochschule in Aschaffenburg entwickelt. Abbildung 3.4 veranschaulicht diese Herangehensweise anhand eines repräsentativen Messsignals der NS. Zunächst erfolgte die Berechnung eines *thresholds* durch die RMS-Methode. Hierfür wurde ein Faktor von 4,5 angewendet, so dass der *threshold* dichter an das Hintergrundrauschen positioniert wurde, als es bei den Signalen der kortikalen Rattenneurone der Fall war. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass bei den Messungen der NS, neben Signalen mit einer negativen Amplitude, auch solche auftraten, die eine positive Amplitude besitzen. Um diese Signale ebenfalls zu erfassen, wurde ein zweiter *threshold* eingefügt, der sich im positiven Bereich des Messsignals befindet. Nachdem die beiden Schwellwerte berechnet wurden, erfolgte die erste Spike Detektion. Alle Messsignale, die den negativen oder den positiven *threshold* überschritten, wurden als vorläufige Spikes angesehen (Abbildung 3.4B, C). In einem nächsten Schritt, suchte der SWTTEO Algorithmus dieselbe Anzahl an Spikes im Messsignal, die von ihrer Form her am besten mit einem neuronalen Signal vergleichbar sind. Wird ein Messsignal lediglich von dem *threshold* Verfahren detektiert und nicht durch den SWTTEO Algorithmus, so wird das Signal als Störsignal angesehen und nicht als Spike betrachtet (Abbildung 3.4B). Detektiert der SWTTEO Algorithmus denselben Spike, der auch durch das Schwellwertverfahren erfasst wurde, so wird das Signal endgültig als Spike angesehen (Abbildung 3.4C). Die weitere Datenanalyse erfolgte wie bei den kortikalen Rattenneuronen. Die Synchronität der vom Netzwerk generierten Signale wurde durch die Detektion von Netzwerkbursts (NB) beurteilt. Hierfür wurde das Produkt aus der Anzahl an Spikes und der Anzahl aktiver Elektroden in einem definierten Zeitfenster berechnet [93]. Überschreitet dieses Produkt einen definierten *threshold*,

so wird ein NB detektiert. In dieser Arbeit wurde ein Zeitfenster von 500 ms und ein *threshold* von 600 gewählt.

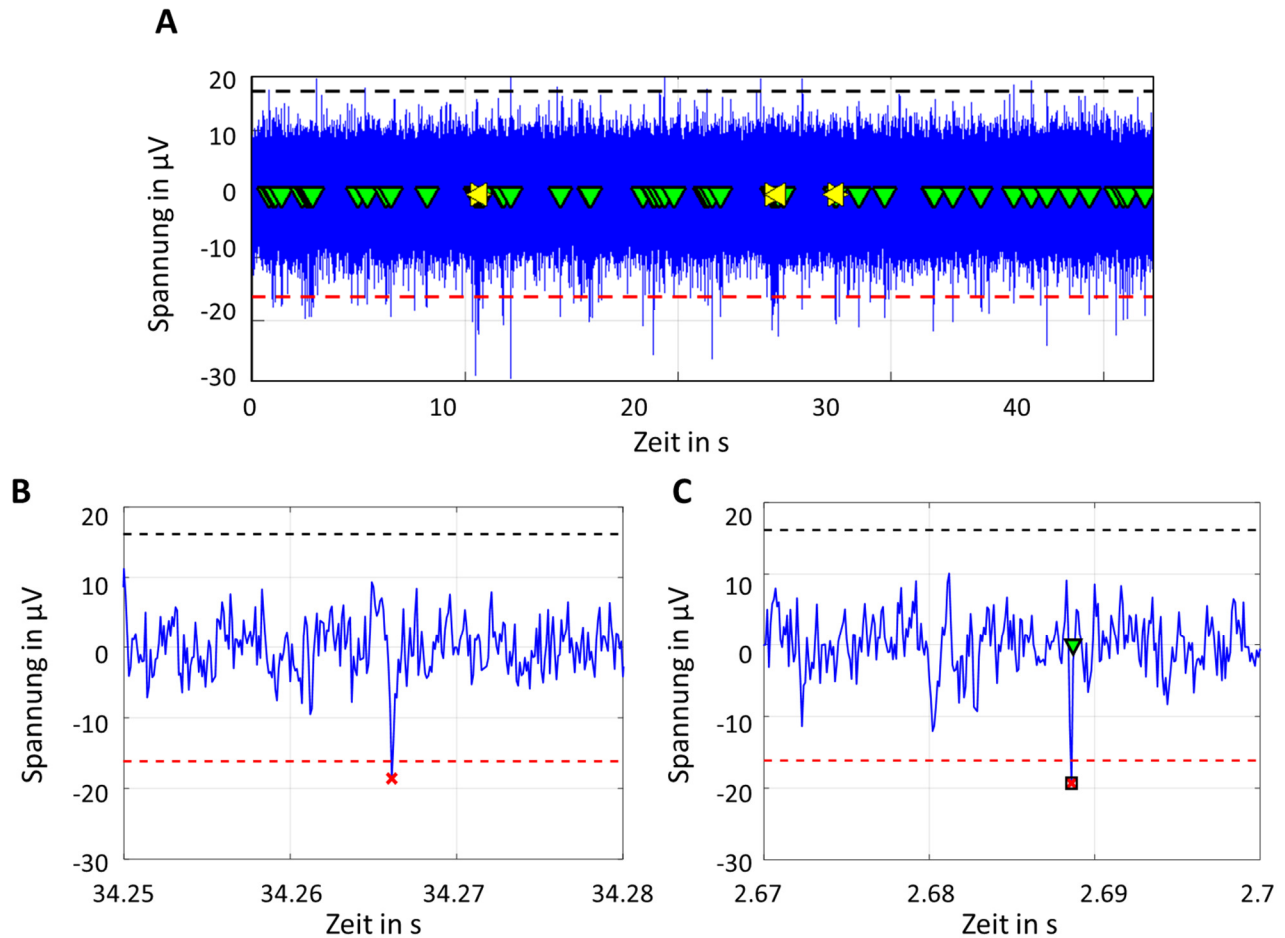


Abbildung 3.4: Die Kombination der *threshold* Berechnung mit dem SWTTEO Algorithmus führt zu einer zuverlässigeren Spike Detektion bei Messungen mit einem schlechten Signal-Rausch Verhältnis. Eine repräsentative Messung der elektrischen Aktivität einer Neurosphäre an einer individuellen Elektrode, bei der Spikes mit einem grünen und Bursts mit einem gelben Pfeil markiert sind (A). Die Spike Detektion wurde mit einem Verfahren durchgeführt, bei dem das üblicherweise verwendete Schwellwertverfahren, um einen zusätzlichen Evaluationsschritt mit dem SWTTEO Algorithmus, erweitert wurde. Signale, die nur durch das Schwellwertverfahren detektiert wurden, werden mit einem roten x markiert (B). Signale, die von beiden Algorithmen als Spike detektiert wurden, werden zusätzlich mit einem schwarzen Rechteck markiert (C). Nur diese Signale werden endgültig als Spike angesehen und mit einem grünen Dreieck markiert.

3.3.6. Reinigung der MEA Chips

Die MEA Chips konnten nach Abschluss eines Experiments wiederverwendet werden. Hierfür war es erforderlich, die zellulären Rückstände des vorherigen Experimentes von der Oberfläche der MEA Chips zu entfernen. Für die Reinigung wurde eine 1 %ige Tergazymlösung verwendet. Diese wurde in die Kavitäten der MEA Chips gefüllt und über Nacht bei RT auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die MEA Chips mit destilliertem Wasser gewaschen, mit 70% Ethanol desinfiziert und einer 45-minütigen UV-Sterilisation unterzogen.

3.4. Pharmakologische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Studie wurde die elektrophysiologische Reaktion der NS auf den GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicucullin (10 μ M in PBS) und den Natriumkanalblocker Carbamazepin (40 μ M, gelöst in Dimethylsulfoxid, DMSO) untersucht.

Die pharmakologischen Untersuchungen fanden an Tag 19 der elektrischen Aktivität statt. Zunächst wurden die elektrischen Signale jeder Kultur 1 Minute lang gemessen, um einen Eindruck über das native Aktivitätsmuster zu erhalten. Anschließend erfolgte die Applikation von Bicucullin oder Carbamazepin. Die Messung der modifizierten Netzwerkaktivität erfolgte umgehend nach Zugabe der entsprechenden Substanz. Die Messdauer nach Applikation von Bicucullin betrug 15 Minuten und nach Carbamazepin 5 Minuten. Anschließend wurde die Lösung mehrfach durch frisches Nährmedium ausgetauscht. Nach einer fünf minütigen Wartezeit erfolgte die letzte Messung, um zu überprüfen, ob sich das native Aktivitätsmuster wieder eingestellt hat.

Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Netzwerkaktivität auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollkulturen mitgeführt, die lediglich mit den Lösungsmitteln (PBS oder DMSO) exponiert wurden. Hierfür wurden die Kontrollkulturen für den Bicucullinversuch mit 20 μ l 1x PBS behandelt und die Kontrollkultur für den Carbamazepinversuch mit 20 μ l 100 % DMSO.

3.5. Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlung der kortikalen Neurone aus der Ratte wurde an der TU Darmstadt durchgeführt. Als Strahlenquelle wurde eine Philips MCN 165/796704 Röntgenröhre mit einer Wolframanode verwendet. Der Strahlenaustritt erfolgte über das oberhalb der Quelle liegende Berylliumfenster. Während der Bestrahlung wurden die Proben auf eine 2 mm Aluminiumplatte in einem Abstand von 39 cm zur Strahlenquelle positioniert. Die Bestrahlung wurde mit einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 33,7 mA durchgeführt. Die applizierten Strahlendosen von 1 Gy und 2 Gy wurden mithilfe eines Dosimeters überprüft, das auf den Proben positioniert wurde. Die Bestrahlung der Rattenneurone erfolgte an 16 *div*. Die neuronale Aktivität der bestrahlten Proben wurde bis Tag 10 nach Bestrahlung untersucht.

Die Röntgenbestrahlung der hESC, aus denen nachfolgend wie in Kapitel 3.1 beschrieben die NS hergestellt wurden, erfolgte am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt. Als Strahlenquelle wurde eine Röntgenröhre des Modells Isovolt DS1 verwendet, die mit einer Spannung von 250 kV und eine Stromstärke von 16 mA betrieben wurde und 3 Filter aus Beryllium (7 mm), Aluminium (1 mm) und Kupfer (1 mm) besitzt. Während der Bestrahlung wurden die Proben in einem Abstand von etwa 25 cm zur Strahlenquelle positioniert. Auch hier wurde die applizierte Strahlendosis von 1 Gy mithilfe eines Dosimeters überprüft. Die Bestrahlung erfolgte 4 Tage vor Beginn der

Differenzierung zu NSC. Die elektrische Aktivität der NS wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht.

Um auszuschließen, dass der Transport zur Röntgenröhre einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurden entsprechende Kontrollkulturen mitgeführt.

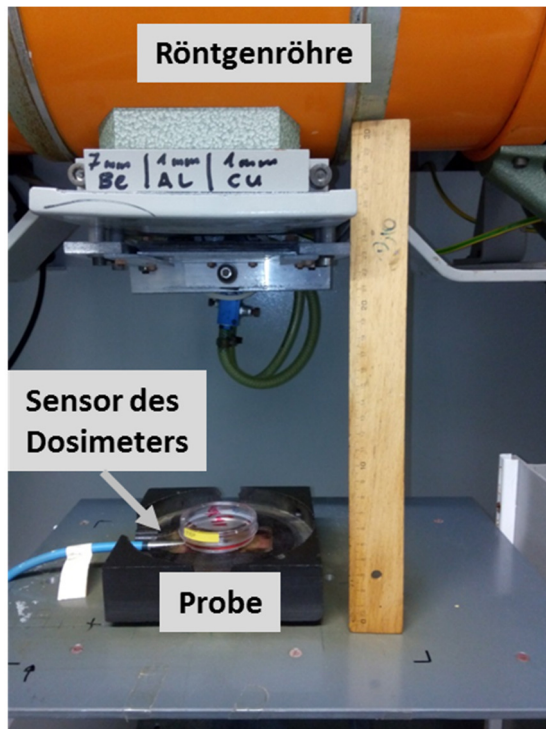


Abbildung 3.5: Exposition humaner embryonaler Stammzellen mit Röntgenstrahlung an der GSI in Darmstadt. Die zu bestrahlende Probe wurde, etwa 25 cm von der Strahlenquelle entfernt, in einer horizontalen Lage positioniert. Der Sensor des Dosimeters wurde so nahe wie möglich bei den Zellen platziert.

3.6. Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen

Die Bestrahlung der embryonalen Stammzellen mit Kohlenstoff-Ionen wurde stets am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT) durchgeführt. Der Transport der Proben von der GSI nach Heidelberg erfolgte mithilfe eines Reiseinkubators, der eine konstante Temperatur von 37 °C während des Transportes gewährleistete (Abbildung 3.6A). Die Bestrahlung erfolgte mit einem SOBP von 25 mm und einem LET von 75 keV/ μ m. Die applizierten Strahlendosen betrugen 0,25 Gy und 0,5 Gy.

Die Exposition der hESC fand 4 Tage vor Beginn der Differenzierung zu NSC statt. Für die Bestrahlung, sowie den Transport der hESC wurden T25-Zellkulturflaschen verwendet, die komplett mit Medium befüllt und mit Parafilm abgedichtet wurden. Aufgrund des in horizontaler Richtung ausgerichteten Ionenstrahls, mussten die zu bestrahlenden Proben während der Bestrahlung in eine senkrechte Position gebracht werden (Abbildung 3.6B). Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf den Transport zum HIT zurückzuführen sind, wurden entsprechende Kontrollkulturen mitgeführt.

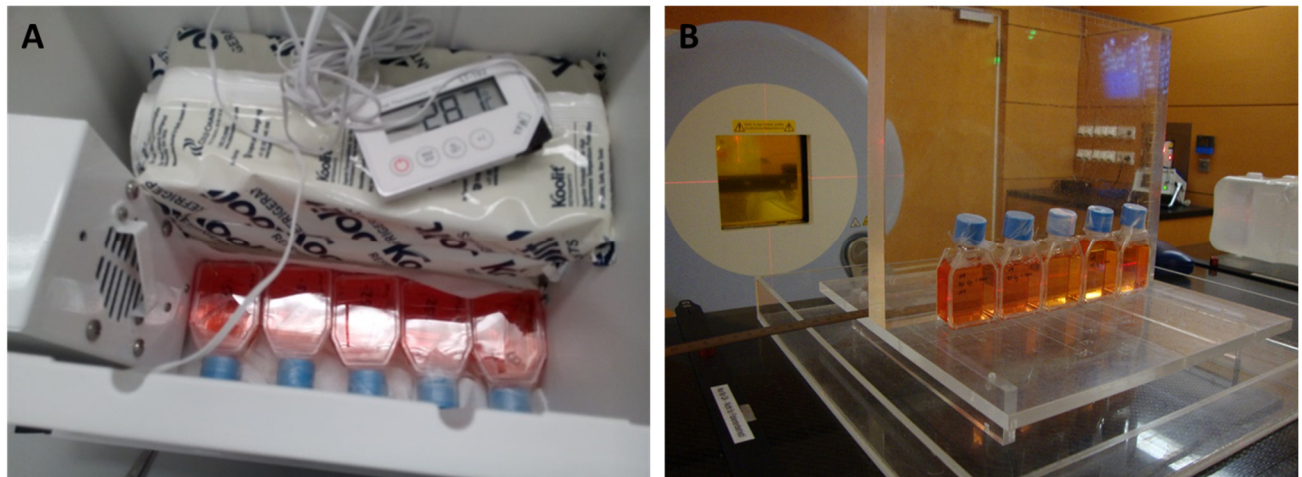


Abbildung 3.6: Exposition humaner embryonaler Stammzellen mit Kohlenstoff-Ionen am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum. Die zu bestrahlenden Proben, sowie die entsprechenden Kontrollkulturen wurden mithilfe eines Reiseinkubators bei konstanten 37 °C zum HIT und anschließend wieder zur GSI transportiert (A). Während der Bestrahlung mussten die Proben, aufgrund der Bauweise des Beschleunigers, in eine senkrechte Position gebracht werden (B).

3.7. Statistik

Vor der statistischen Auswertung wurden die Daten unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf eine Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Daten wurde die statistische Signifikanz mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft. Waren die Daten nicht normalverteilt, erfolgte die statistische Überprüfung durch den Mann-Whitney-U-Test. Für alle statistischen Überprüfungen wurde ein Konfidenz-Intervall (CI) von 95 % mit statistischer Signifikanz für * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ festgelegt.

4. Ergebnisse

In den nachfolgenden Kapiteln werden die im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnisse dargestellt. Hierbei werden zunächst die Ergebnisse behandelt, die mit den kortikalen Neuronen aus der Ratte erzielt wurden (Kapitel 4.1 und 4.2). In den Abschnitten 4.3-4.5 wird das zweite in dieser Arbeit verwendete Zellkultursystem betrachtet, das im Rahmen dieses Projektes im Mittelpunkt stand. Dabei handelt es sich um dreidimensionale Neurosphären, die aus humanen embryonalen Stammzellen differenziert wurden.

4.1. Kortikalen Neurone aus der Ratte

Zunächst wurden die kortikalen Rattenneurone durch immunhistochemische Färbungen hinsichtlich ihrer Morphologie, sowie der vorhandenen Zelltypen hin untersucht.

4.1.1. Immunhistochemische Charakterisierung

Die Morphologie der kortikalen Neurone aus der Ratte, sowie die Qualität der Netzbildung, wurde mithilfe immunhistochemischer Markierungen gegen das MAP2 Protein (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2) analysiert. MAP2 ist ein neuronales Phosphoprotein, das die Struktur und Stabilität von Mikrotubuli, die neuronale Morphogenese, sowie den Transport von Organellen in den Dendriten und Zellkörpern von neuronalen Zellen reguliert [95]. Eine beispielhafte immunhistochemische Färbung einer Kultur an 16 *div* ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da an diesem Kultivierungstag die ersten neuronalen Signale mithilfe des MEA Systems detektiert wurden. Die Färbung zeigt, dass sich die neuronalen Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits zu einem dichten Netzwerk verbunden haben. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass in der Kultur verschiedene Neuronentypen präsent waren. Während einige eine pyramidale Morphologie, erkennbar durch einen apikalen und zwei basale Dendriten, aufwiesen (Abbildung 4.1B), zeigten andere Neurone eine radiale Anordnung der Dendriten (Abbildung 4.1C).

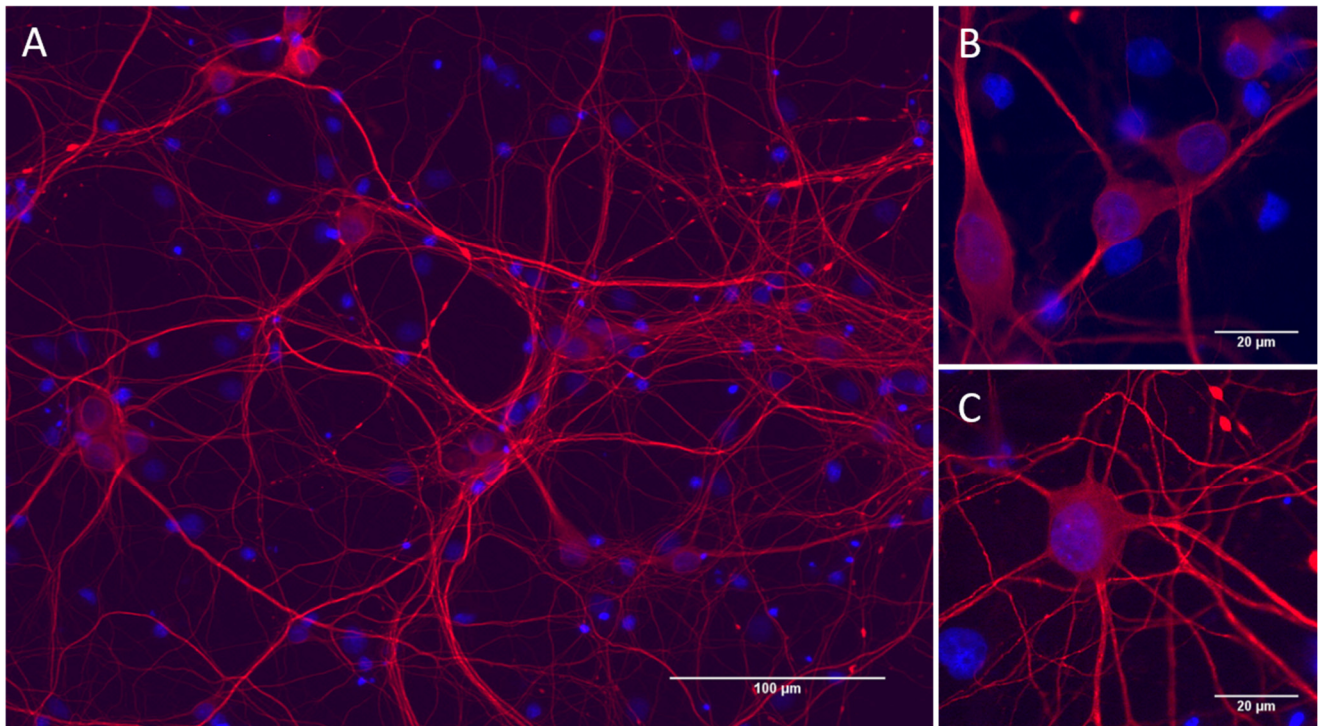


Abbildung 4.1: Netzwerk kortikaler Rattenneurone an 16 *div*. Kortikale Neurone aus der Ratte wurden an 16 *div* fixiert und das Protein MAP2 (rot) immunhistochemisch markiert. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI sichtbar gemacht (blau). Zu diesem Zeitpunkt hat sich ein dichtes Netzwerk entwickelt (A). Die Neurone lassen sich hinsichtlich ihrer Morphologie voneinander unterscheiden. Während einige eine pyramidale Morphologie besitzen (B), weisen andere eine radiale Anordnung der Dendriten auf (C).

Bei diesem Modellsystem handelte es sich nicht um Neuronen-Monokulturen, vielmehr konnte ein großer Anteil der Zellen als Astrozyten identifiziert werden. Um einen Eindruck vom Vorkommen und von der Morphologie der Astrozyten zu erhalten, wurden diese mit einem gegen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) gerichteten Antikörper immunhistochemisch markiert. GFAP ist ein im Zytoplasma reifer Astrozyten vorkommendes Protein, das zur Gruppe der Intermediärfilamente gehört und wichtige Funktionen bei der Motilität, sowie der Formgebung astrozytärer Zellen übernimmt [96]. Eine beispielhafte immunhistochemische Färbung einer Kultur von Rattenneuronen an 16 *div* ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Die GFAP positiven Zellen wiesen eine sternförmige Morphologie, mit zahlreichen verzweigten Ausläufern auf.

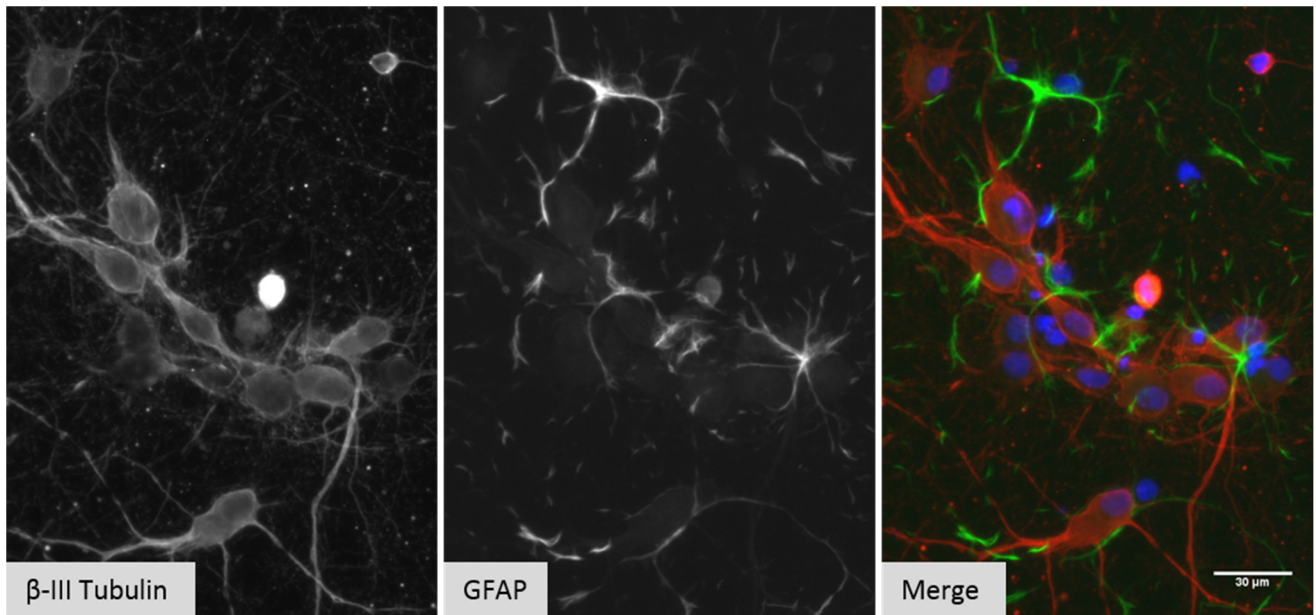


Abbildung 4.2: GFAP positive Zellen in einer Kultur kortikaler Rattenneurone an 16 *div*. Kortikale Neurone aus der Ratte wurden an 16 *div* fixiert und die Proteine GFAP (grün) und β -III Tubulin (rot) immunhistochemisch markiert. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI Färbung markiert (blau). Bei dem Modellsystem handelt es sich um keine Neuronen-Monokultur, vielmehr wurde ein Großteil der Zellen als Astrozyten identifiziert.

Zusätzlich zu den Astrozyten, wurden die Kulturen auf die Präsenz von Oligodendrozyten hin untersucht. Diese Form der Gliazellen ist für die Ausbildung der Myelinscheiden verantwortlich, deren elektrische Isolierung der Nervenfasern eine schnelle Weiterleitung der Aktionspotentiale ermöglicht. Die Markierung der Oligodendrozyten erfolgte durch einen gegen MBP (*Myelin basic protein*) gerichteten Antikörper. Eine beispielhafte immunhistochemische Färbung einer Kultur an 16 *div* ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Die Anzahl der in den Kulturen vorhandenen Oligodendrozyten war sehr gering und derjenigen der Astrozyten weit unterlegen.

Obwohl die vorhandenen Oligodendrozyten meist in enger Nähe zu den Neuronen lokalisiert waren, wurde die Ausbildung einer Myelinscheide nicht beobachtet. Überprüft wurde dies durch eine Doppelfärbung gegen MBP und das Protein β -III Tubulin. Letzteres wird in den Dendriten, dem Soma und in den Axonen postmitotischer Neurone exprimiert. Eine Kolo-kalisation der beiden Marker wurde nicht beobachtet und daher eine Myelinisierung der Axone ausgeschlossen.

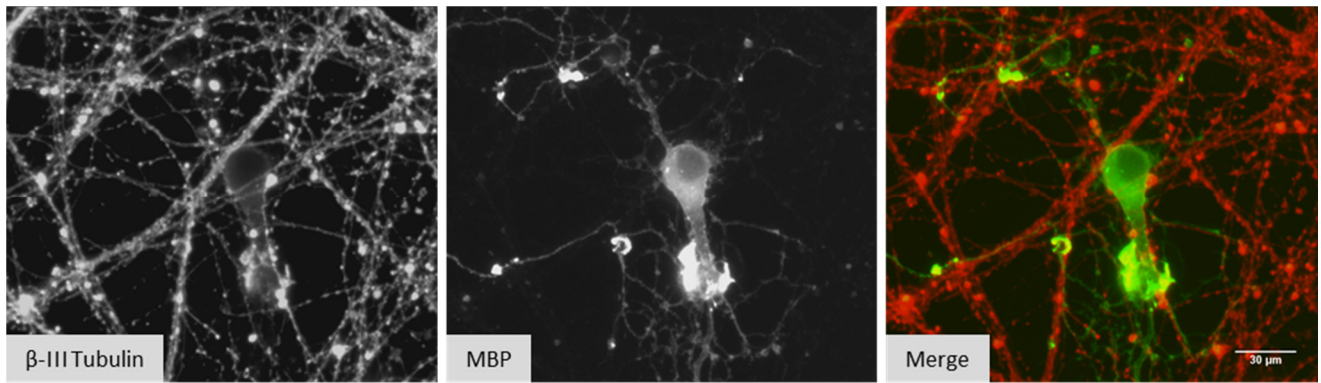


Abbildung 4.3: Oligodendrozyten in einer Kultur kortikaler Rattenneurone an 16 *div*. Kortikale Neurone aus der Ratte wurden an 16 *div* fixiert und die Proteine MBP (grün) und β -III Tubulin (rot) immunhistochemisch markiert. Die Anzahl der MBP positiven Zellen in den Kulturen war sehr gering. Eine Kolokalisation des β -III Tubulin und des MBP Signals wurde nicht beobachtet, so dass eine Myelinisierung der Axone ausgeschlossen werden konnte.

4.1.2. Elektrophysiologische Charakterisierung

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kulturen zu untersuchen, wurden diese auf MEA Chips kultiviert und die neuronalen Signale über einen Zeitraum von 44 Tagen analysiert.

Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Die ersten elektrischen Signale wurden an 16 *div* detektiert. Der Zeitraum der elektrophysiologischen Aktivität variierte stark zwischen den individuellen Chips. In Abbildung 4.4 ist die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen in Prozent bis 44 *div* dargestellt. In allen Kulturen wurden bis 22 *div* elektrische Signale detektiert. An 23 *div* sinkt der prozentuale Anteil elektrisch aktiver Kulturen auf 88 %. Im Laufe der weiteren Kultivierung verringerte sich die Anzahl fortlaufend auf einen Wert von 50 % an 44 *div*. Am darauffolgenden Tag kam es zu einer drastischen Reduzierung. Nur noch eine von anfangs 18 Kulturen zeigte noch eine spontane Signalgenerierung. An 49 *div* stellt die letzte Probe ihre Funktionalität ein.

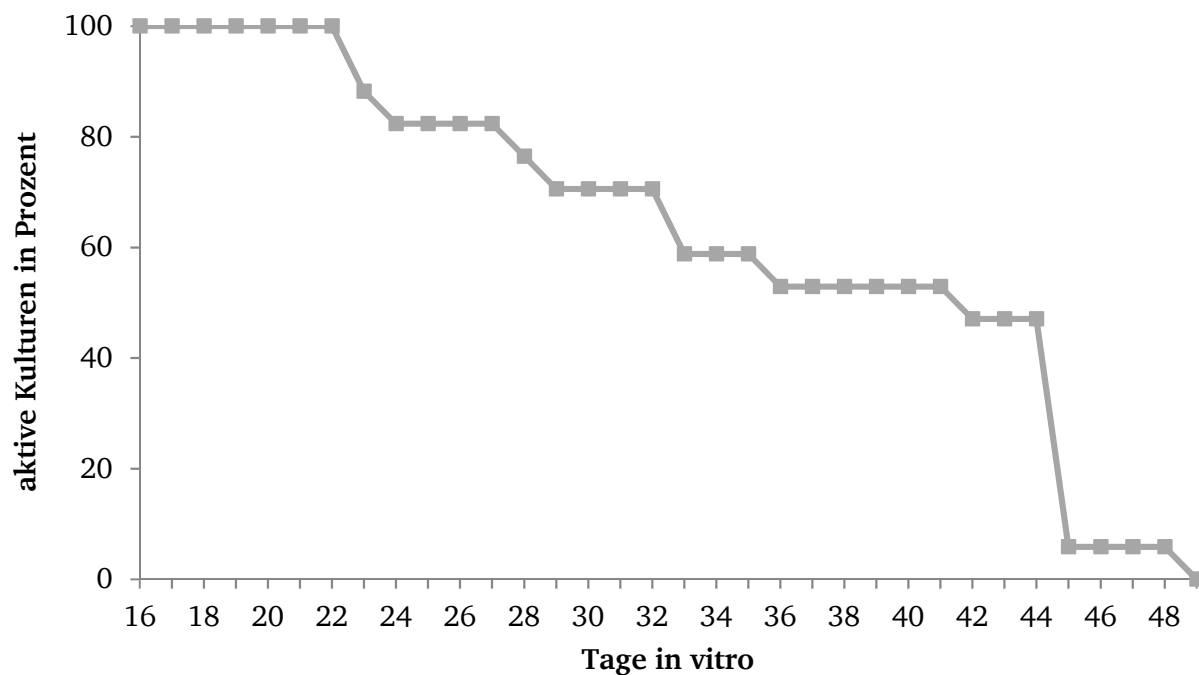


Abbildung 4.4: Zeitraum elektrischer Aktivität kortikaler Rattenneurone. Die Anzahl der elektrophysiologisch aktiven Kulturen kortikaler Rattenneurone ist prozentual gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die ersten elektrischen Signale wurden an 16 *div* detektiert. An 44 *div* zeigten noch etwa 50 % der Kulturen elektrische Signale. An den darauffolgenden Tagen verringert sich die Anzahl aktiver Kulturen drastisch und fiel an 49 *div* auf 0 % ab. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden durch zwei voneinander unabhängige Experimente mit insgesamt 18 Kulturen (Experiment 1: n = 8, Experiment 2: n = 10) gewonnen.

Anzahl aktiver Elektroden

Die Anzahl der aktiven Elektroden gibt Aufschluss über die flächige Verteilung der Neurone auf dem Elektrodenfeld, sowie deren Fähigkeit spontane elektrische Signale zu generieren. Bei der Zellaussaat wurde das gesamte Elektrodenfeld mit Neuronen bedeckt. Diese adhären auf dem Substrat, verbinden sich miteinander zu einem dichten Netzwerk und beginnen an 16 *div* mit der spontanen Signalgenerierung. Abbildung 4.5 zeigt die Anzahl der aktiven Elektroden beginnend an 16 *div* ($8,94 \pm 2,0$ aktive Elektroden pro MEA Chip). Bereits an 17 *div* hat sich die Anzahl der aktiven Elektroden verdoppelt. Da bereits zu Beginn sämtliche Elektroden mit Neuronen bedeckt waren, ist diese Zunahme nicht auf ein Auswachsen der Zellen zurückzuführen. Vielmehr beginnen Bereiche des Netzwerks spontan aktiv zu werden, die zuvor keine elektrische Aktivität gezeigt haben. An den darauffolgenden Tagen kam es zu starken Schwankungen. Diese sind jedoch statistisch gesehen nicht signifikant und daher auf temporäre Schwankungen innerhalb der Kulturen zurückzuführen.

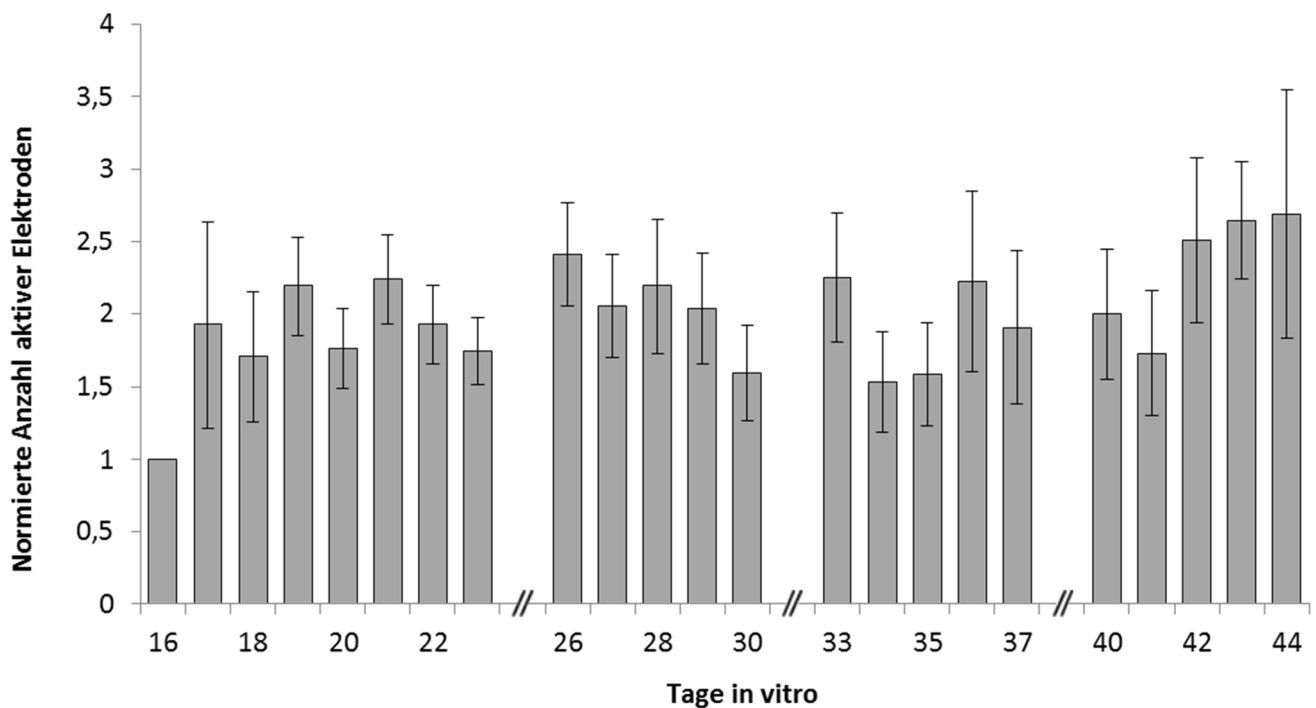


Abbildung 4.5: Entwicklung der Anzahl aktiver Elektroden im Laufe der Kultivierung. Die auf Tag 16 normierte Anzahl aktiver Elektroden ist gegen die Tage *in vitro* aufgetragen ($8,94 \pm 2,0$ aktive Elektroden pro MEA Chip an 16 *div*). Bereits an 17 *div* verdoppelte sich die Anzahl der aktiven Elektroden. An den darauffolgenden Tagen sind deutlichen Schwankungen zu erkennen, die statistisch gesehen jedoch nicht signifikant sind. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängige Experimente mit insgesamt 18 Kulturen (Experiment 1: $n = 8$, Experiment 2: $n = 10$). Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft.

Entwicklung der elektrischen Signale

Die Entwicklung der von den Netzwerken generierten Spikes, die von den 59 Messelektroden eines MEA Chips detektiert wurden, ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die ersten elektrischen Signale wurden an 16 *div* detektiert. Dabei handelte es sich zunächst überwiegend um einzeln auftretende Spikes. Abbildung 4.6A zeigt eine typische extrazelluläre Ableitung an einer Elektrode an 16 *div*. Die Vergrößerung in Abbildung 4.6B zeigt die typische Form eines spontan auftretenden Spikes. An 16 *div* betrug die Summe aller Spikes pro Minute und pro MEA Chip durchschnittlich $894,77 \pm 365,6$. Die Anzahl der Spikes nahm im Laufe der nächsten Tage zu, bis an 21 *div* ein siebenfach erhöhter Wert erreicht wurde. Zurückzuführen ist dies einerseits auf eine erhöhte Anzahl aktiver Elektroden (vgl. Abbildung 4.5) und andererseits auf eine höhere Anzahl an detektierten Signalen an den einzelnen Elektroden. An den darauffolgenden Kultivierungstagen traten tagesabhängige Schwankungen auf, die Anzahl der Spikes blieb jedoch weitestgehend konstant (Abbildung 4.6C).

Die Amplitudenhöhe der detektierten Spikes war variabel und betrug in der Regel zwischen -50 und -100 μV . Aber auch Werte von bis zu -300 μV wurden von einzelnen Elektroden detektiert. Diverse Faktoren haben einen Einfluss auf den Wert der Signalamplitude, wie beispielsweise die Distanz

zwischen Zelle und Elektrode, die Zellgeometrie, sowie die Qualität der Elektrode. Die Höhe der Signalamplituden blieb im Laufe der Kultivierungszeit konstant, was für ein gutes Adhäsionsverhalten der Zellen auf dem Elektrodenfeld der MEA Chips angesehen werden kann.

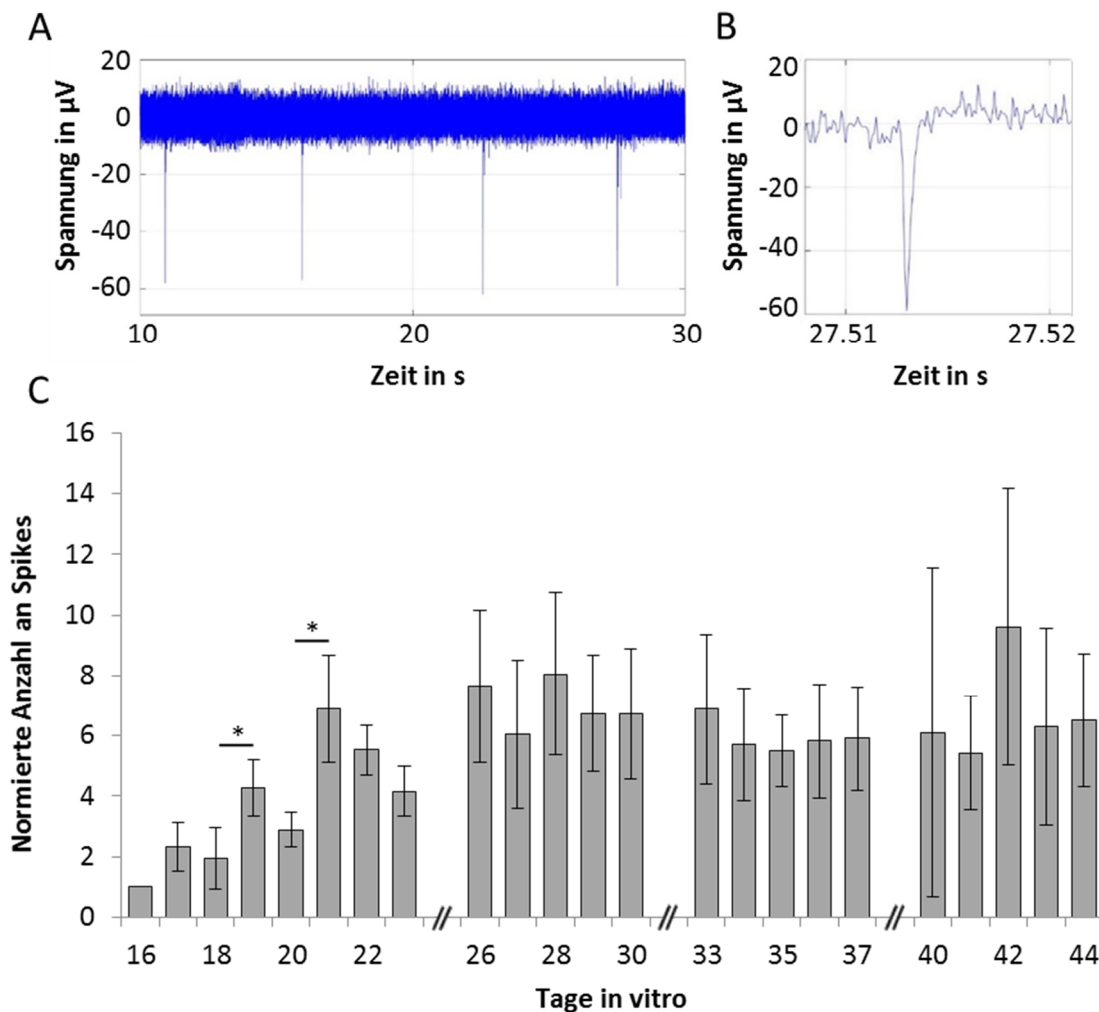


Abbildung 4.6: Entwicklung der von kortikalen Rattenneuronen generierten Spikes. Extrazelluläre Ableitung von einer Elektrode an 16 div (A). Vergrößerter Ausschnitt eines spontan auftretenden Spikes (B). Die auf Tag 16 normierte Anzahl an Spikes pro Minute, die von allen Elektroden eines MEA Chips detektiert wurden, ist gegen die Tage *in vitro* aufgetragen ($894,77 \pm 365,6$ Spikes pro MEA Chip an 16 div). An 21 div hat sich die Anzahl der Spikes um das Siebenfache erhöht. An den darauffolgenden Tagen blieb die Anzahl der Spikes weitestgehend konstant (C). Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängige Experimente mit insgesamt 18 Kulturen (Experiment 1: $n = 8$, Experiment 2: $n = 10$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft (CI = 95 %, * $p < 0,05$).

Die Entwicklung der von dem Netzwerk generierten Bursts ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Abbildung 4.7A zeigt eine typische extrazelluläre Ableitung einer Elektrode an 20 div, an der Bursts detektiert wurden. An 16 div betrug die Summe aller Bursts pro Minute und pro MEA Chip durchschnittlich $51,17 \pm 15,1$. Ebenso wie die Anzahl der Spikes, stieg auch die Anzahl der Bursts im Laufe der folgenden Tage an. An 26 div hat sich die Anzahl der Bursts um das Fünffache erhöht. An den darauffolgenden

Kultivierungstagen blieb die Anzahl der Bursts weitestgehend konstant (Abbildung 4.7B). Die in den Experimenten detektierten Bursts bestanden an 16 *div* durchschnittlich aus $6,94 \pm 0,6$ Spikes und hatten eine durchschnittliche Dauer von $0,97 \pm 0,2$ s. Während die Anzahl der Spikes pro Burst im Laufe der Kultivierung konstant blieb, verringerte sich die Dauer der Bursts. An 44 *div* betrug diese im Durchschnitt noch $0,55 \pm 0,1$ s.

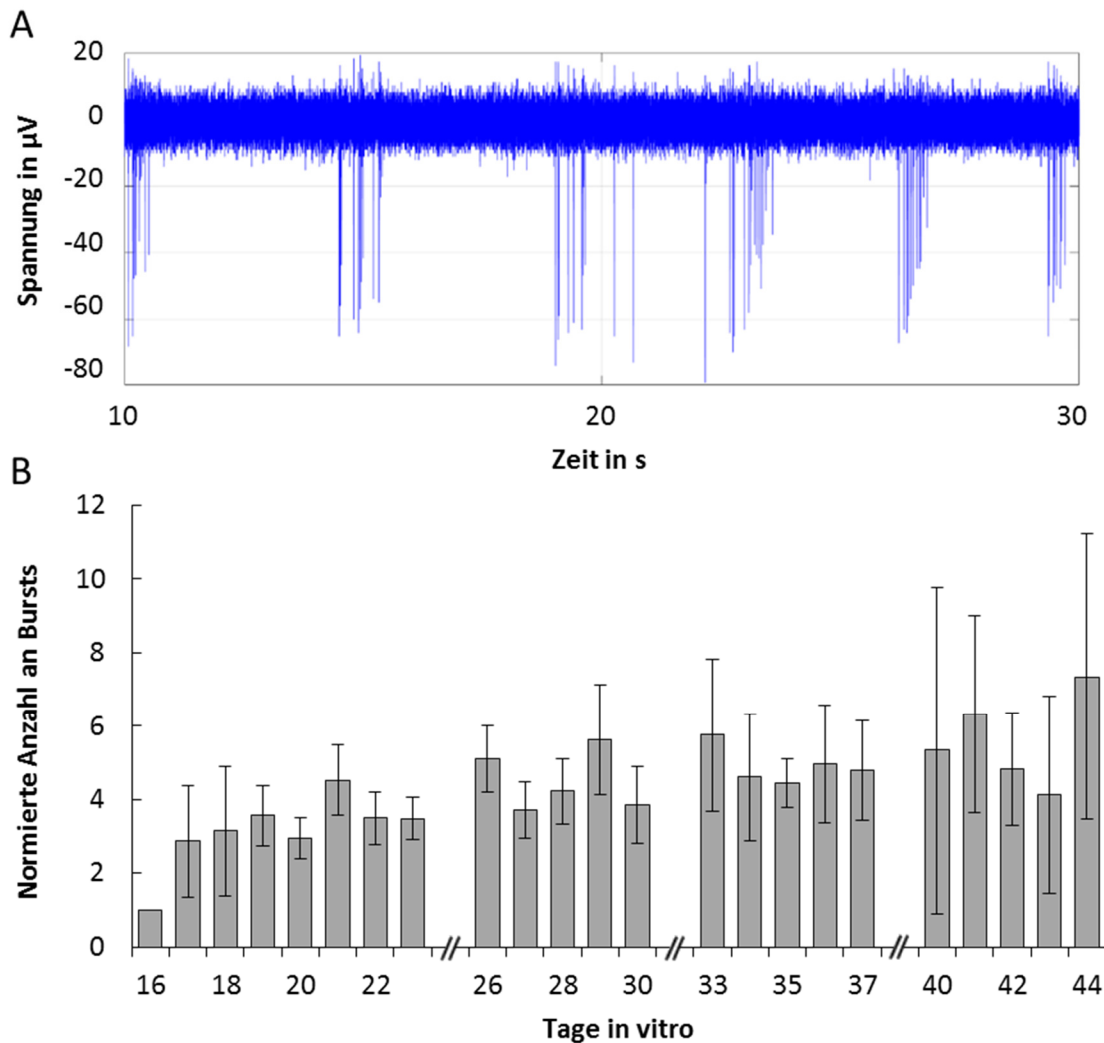


Abbildung 4.7: Entwicklung der von kortikalen Rattenneuronen generierten Bursts. Extrazelluläre Ableitung von einer Elektrode an 20 *div* (A). Die auf Tag 16 normierte Anzahl an Bursts pro Minute, die von allen Elektroden eines MEA Chips detektiert wurden, ist gegen die Tage *in vitro* aufgetragen ($51,17 \pm 15,1$ Bursts pro MEA Chip an 16 *div*). Bis 26 *div* erhöht sich die Anzahl der Bursts auf das Fünffache und blieb anschließend weitestgehend konstant (B). Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit insgesamt 18 Kulturen (Experiment 1: $n = 8$, Experiment 2: $n = 10$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft.

Entwicklung der Netzwerkaktivität

Ein generelles Merkmal neuronaler Netzwerke *in vitro* ist die Entwicklung eines Aktivitätsmusters, das von synchronen Bursts dominiert wird. Diese Entwicklung wurde auch bei den kortikalen Neuronen aus der Ratte nachgewiesen. Das Aktivitätsmuster einer Neuronenkultur an 16 *div*, 26 *div* und 44 *div* ist in Abbildung 4.8 in Form eines Rasterplots dargestellt. Bei dieser Darstellungsform wird jeder durch die Datenanalyse detektierte Spike in Form eines Punktes dargestellt. Aneinander gereihte, grün markierte Punkte stellen mehrere schnell hintereinander auftretende Spikes, und somit Bursts dar. Aufgetragen ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Das Aktivitätsmuster an 16 *div* bestand überwiegend aus einzelnen Spikes und unregelmäßig auftretenden Bursts. An 26 *div* hatte sich ein Aktivitätsmuster entwickelt, bei dem synchron auftretende Bursts detektiert wurden. An 44 *div* wurde das Aktivitätsmuster von synchron auftretenden Bursts dominiert, wobei in den Inter-Burst-Intervallen kaum noch individuelle Spikes auftraten.

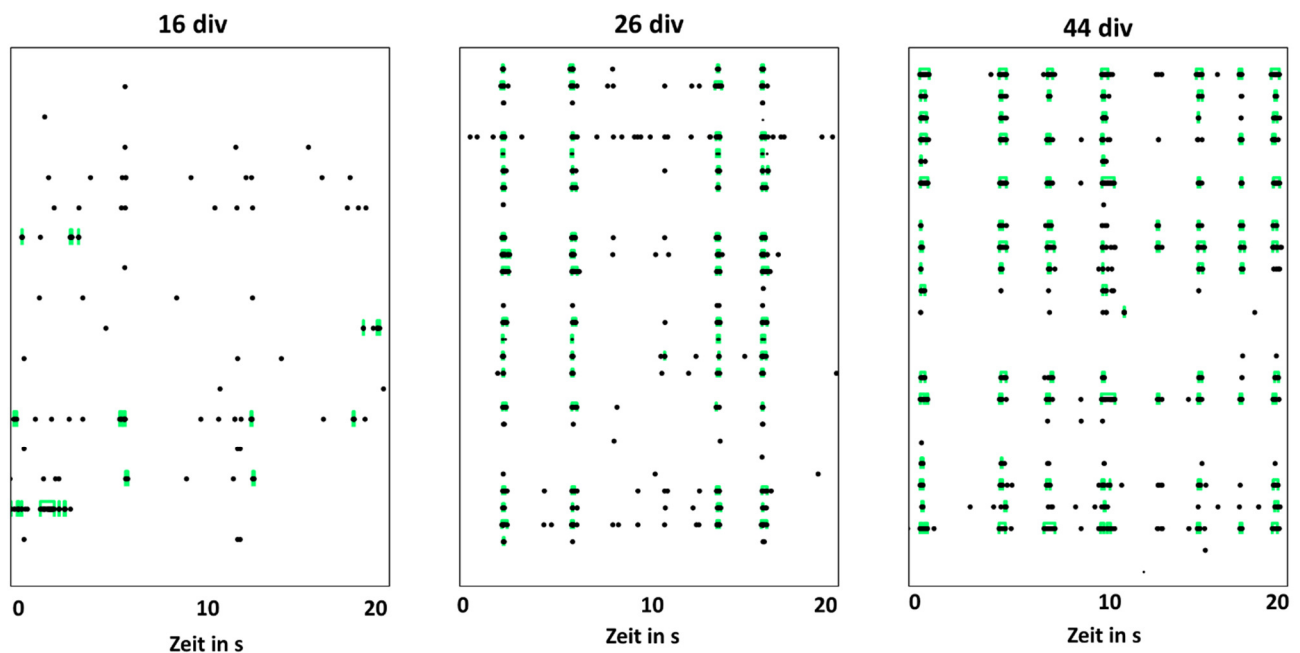


Abbildung 4.8: Entwicklung der Netzwerkaktivität kortikaler Rattenneurone. Die elektrische Aktivität der Neuronenkulturen wurde an 16 *div*, 26 *div* und 44 *div* aufgezeichnet und ist hier in Form eines Rasterplots dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder einzelne Punkt einen Spike und aneinander gereihte, grün markierte Punkte einen Burst. Dargestellt ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Da die Entwicklung der individuellen Kulturen vergleichbar war, ist hier nur eine Messung exemplarisch dargestellt. An 16 *div* sind nur wenige Bursts zu erkennen, die in unregelmäßigen Abständen auftreten. Im Laufe der Kultivierung entwickelt sich ein Aktivitätsmuster, das von synchronen Bursts dominiert wird.

4.2. Röntgenbestrahlung der kortikalen Neurone aus der Ratte

Um zu überprüfen, ob eine Exposition mit ionisierender Strahlung einen Einfluss auf das elektrische Aktivitätsmuster der Rattenneurone hat, wurden diese an 16 *div* mit Röntgenstrahlung exponiert und anschließend die Entwicklung der Netzwerkaktivität bis 26 *div* analysiert. Zusätzlich dazu wurde die Induktion, sowie die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) untersucht.

4.2.1. Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Exposition mit ionisierender Strahlung verursacht gravierende Schäden in Zellen, wie beispielsweise die Induktion von DNA-DSB. Um diese in den Rattenneuronen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Antikörperfärbungen gegen γ H2AX durchgeführt (Abbildung 4.9A).

Um eine Aussage über die Anzahl der strahleninduzierten DNA-DSB zu treffen, wurden diese manuell ausgezählt (Abbildung 4.9B). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte wurde in den Kontrollproben ein erhöhtes γ H2AX-Signal nachgewiesen. Im Durchschnitt besaß lediglich jeder siebte bis achte Zellkern einen spontan auftretenden DNA-DSB. Die Bestrahlung mit Röntgendosen von 1 Gy und 2 Gy hatte einen dosisabhängigen Anstieg der DNA-DSB zur Folge. Durch die Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy wurden 30 Minuten und eine Stunde nach Bestrahlung im Durchschnitt 11-12 DSB pro Zellkern nachgewiesen. Die Verdopplung der Strahlendosis auf 2 Gy führte zu einer Erhöhung dieser Anzahl auf etwa 20-21. Drei Stunden nach der Bestrahlung waren bereits weniger DNA-DSB nachweisbar. Bei den mit 1 Gy bestrahlten Proben wurden pro Zellkern noch etwa 10 DSB nachgewiesen und bei den mit 2 Gy exponierten Proben im Durchschnitt noch 14. 24 Stunden nach der Röntgenexposition hatte sich die Anzahl der DNA-DSB in allen Proben deutlich verringert. Die mit 1 Gy bestrahlten Proben zeigten nur noch vereinzelte DSB, die sich in ihrer Anzahl nicht mehr von derjenigen der Kontrollproben unterschieden. Bei einer Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy, waren zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt noch 4 DNA-DSB pro Zellkern nachweisbar.

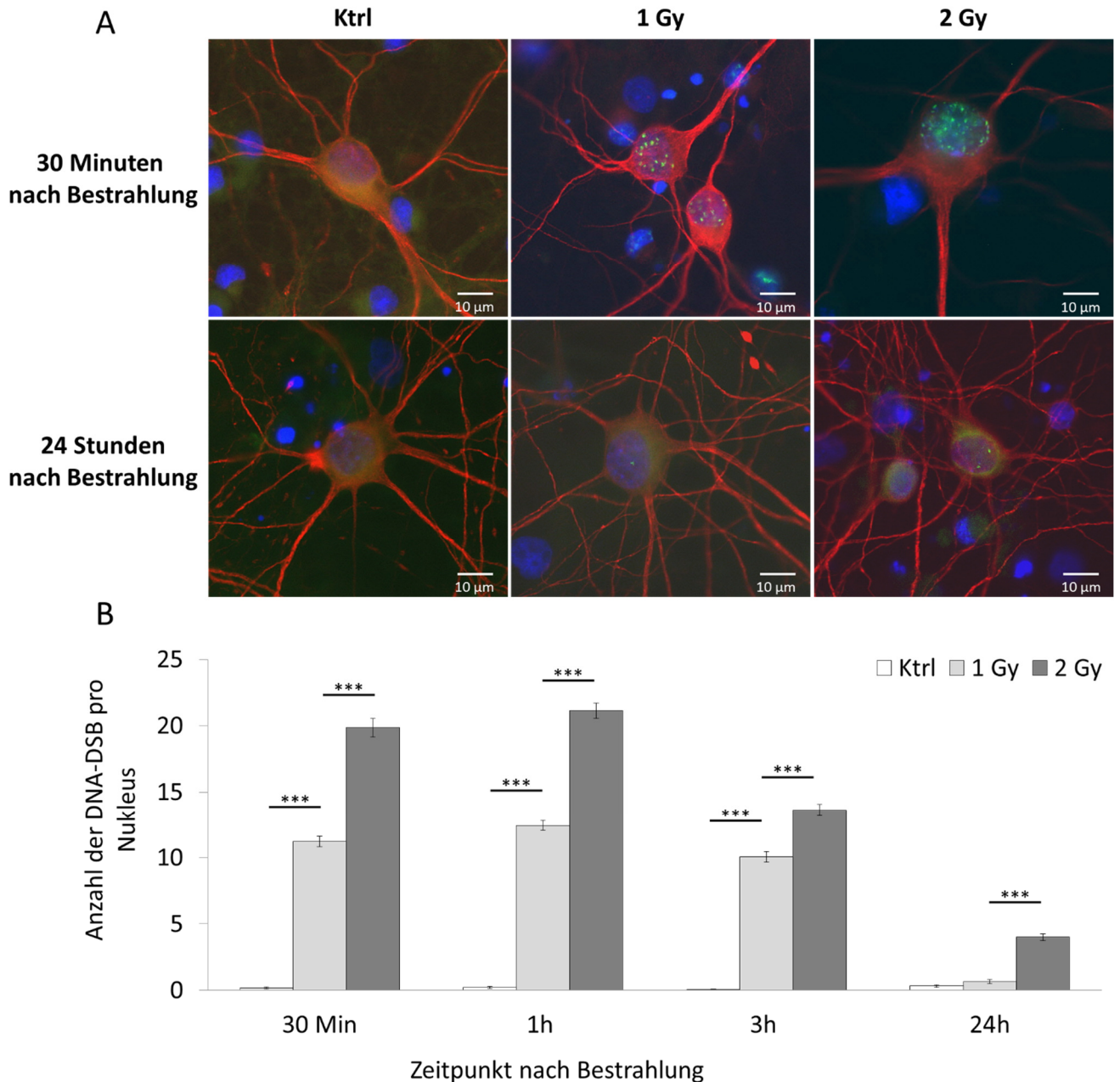


Abbildung 4.9: Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Exposition mit Röntgenstrahlung. Korticale Neurone aus der Ratte wurden an 16 *div* einer Exposition mit Röntgenstrahlung ausgesetzt und die Induktion von DNA-DSB, sowie die Reparaturkapazität der Zellen, mithilfe immunhistochemischer Antikörperfärbungen gegen die phosphorylierte Form des Histons H2AX, untersucht (A). Die manuelle Auszählung der γ H2AX-markierten DNA-DSB (B) zeigte, dass die Exposition mit Röntgendosen von 1 Gy und 2 Gy einen dosisabhängigen Anstieg des γ H2AX-Signals pro Zellkern zur Folge hatte. 24 Stunden nach der Exposition war nur noch in den mit 2 Gy exponierten Kulturen ein erhöhtes γ H2AX-Signal nachweisbar. Die hier gezeigten Daten stellen den Mittelwert \pm Standardfehler von 50 Zellkerne pro Strahlendosis und Zeitpunkt dar. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft (CI = 95 %, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2.2. Elektrophysiologische Eigenschaften nach Exposition mit Röntgenstrahlung

Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Um zu überprüfen, ob die Exposition mit Röntgenstrahlung einen Einfluss auf den Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität hat, wurden die Kulturen, bis zum zehnten Tag nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy oder 2 Gy, täglich auf ihre Funktionalität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Im Laufe der ersten vier Tage nach der Exposition mit Röntgenstrahlung wurden bei allen Kulturen elektrische Signale detektiert. An Tag 6 stellte eine von 3 Kulturen, die mit einer Dosis von 1 Gy behandelt wurden, ihre spontane Signalgenerierung ein. Bei allen verbleibenden Kulturen wurden bis zum Versuchsende elektrische Signale detektiert.

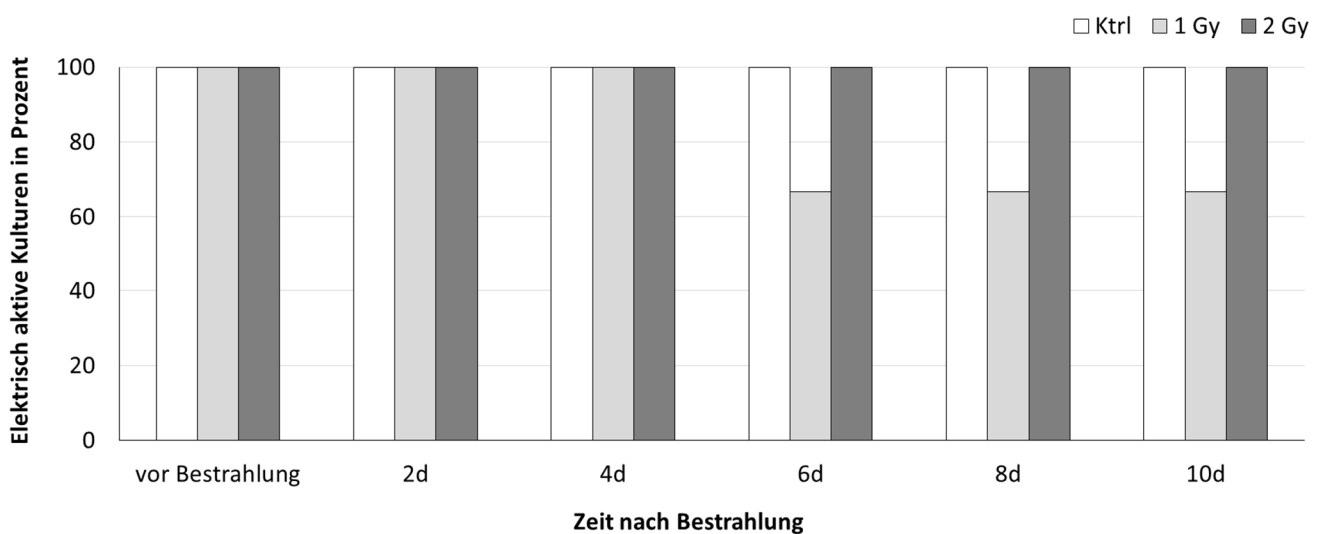


Abbildung 4.10: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf den Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität. Die Anzahl elektrophysiologisch aktiver Kulturen ist prozentual gegen die Tage nach der Exposition mit Röntgenstrahlung aufgetragen. Die Bestrahlung erfolgte an 16 div. Die verwendeten Strahlendosen betrugen 1 Gy und 2 Gy. Lediglich an Tag 6 nach Bestrahlung stellte eine Probe, die mit 1 Gy bestrahlt wurde, die spontane Signalgenerierung ein. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes (Kontrolle: n = 4, 1 Gy: n = 3, 2 Gy: n = 4).

Anzahl aktiver Elektroden

Um zu überprüfen, ob eine Exposition mit Röntgenstrahlung die Einstellung der spontanen Signalgenerierung in bestimmten Bereichen des Netzwerks zur Folge hat, wurde die Anzahl der aktiven Elektroden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung analysiert. Abbildung 4.11A zeigt die Ergebnisse der Messungen, die im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung durchgeführt und auf die Werte vor der Exposition mit Röntgenstrahlung normiert wurden. Die Anzahl der aktiven Elektroden vor Bestrahlung betrug im Durchschnitt $8,75 \pm 0,4$ in den Kontrollen, $9,25 \pm 1,7$ in der mit 1 Gy exponierten Versuchsgruppe und $5,75 \pm 1,6$ in den mit 2 Gy bestrahlten Kulturen. Im Laufe des ersten Tages nach Bestrahlung wurden nur geringfügige Abweichungen zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben beobachtet. Diese sind statistisch gesehen jedoch nicht signifikant und eher auf

temporäre Schwankungen innerhalb der Kulturen zurück zu führen. Abbildung 4.11B zeigt die Ergebnisse der Messungen, die bis zum Versuchsende an Tag 10 nach Bestrahlung durchgeführt wurden. Ab Tag 6 ist bei den Proben, die mit einer Strahlendosis von 2 Gy bestrahlt wurden, eine höhere Anzahl aktiver Elektroden zu beobachten. Diese Erhöhung ist statistisch gesehen jedoch ebenfalls nicht signifikant.

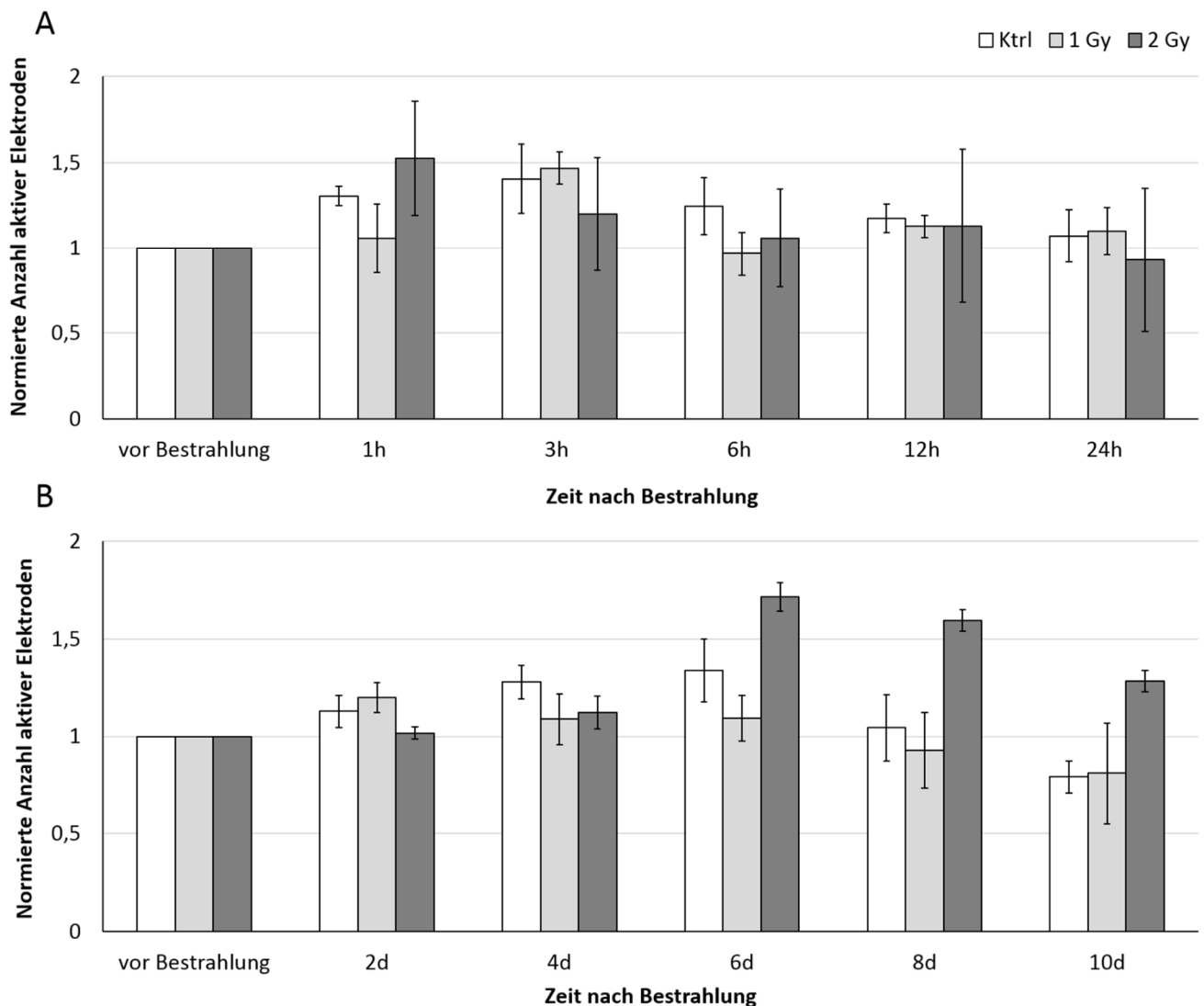


Abbildung 4.11: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl der aktiven Elektroden. Die auf den Wert vor Bestrahlung normierte Anzahl aktiver Elektroden ist gegen die Zeitpunkte nach der Exposition mit Röntgenstrahlung aufgetragen (Anzahl aktiver Elektroden vor Bestrahlung: Ktrl: $8,75 \pm 0,4$, 1 Gy: $9,25 \pm 1,7$, 2 Gy: $5,75 \pm 1,6$). Die Bestrahlung der kortikalen Rattenneurone wurde an 16 *div* durchgeführt. Die verwendeten Strahlendosen betrugen 1 Gy oder 2 Gy. Im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung wurden keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Kulturen nachgewiesen (A). Messungen bis zum Ende des Experiments an Tag 10 nach Bestrahlung deuten darauf hin, dass die mit 2 Gy bestrahlten Kulturen ab Tag 6 eine erhöhte Anzahl aktiver Elektroden besitzen (B). Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 4$, 1 Gy: $n = 3$, 2 Gy: $n = 4$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft.

Anzahl der elektrischen Signale

Um zu überprüfen, ob eine Exposition mit Röntgenstrahlung einen Einfluss auf die Anzahl der spontan generierten elektrischen Signale hat, wurde die Anzahl der von den Rattenneuronen detektierten Spikes zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung analysiert. Vor der Bestrahlung betrug die Anzahl der Spikes pro Minute im Durchschnitt $340,5 \pm 76,2$ in den Kontrollen, $413 \pm 134,3$ in der mit 1 Gy exponierten Versuchsgruppe und $206,5 \pm 65,0$ in den mit 2 Gy bestrahlten Kulturen. Abbildung 4.12A zeigt die Ergebnisse der Messungen, die im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgten und auf die Werte vor der Bestrahlung normiert wurden. Eine Stunde nach der Bestrahlung wurde eine höhere Anzahl an Spikes detektiert, als vor der Exposition. Da dies jedoch auch in den Kontrollkulturen beobachtet wurde, ist dieser Effekt nicht auf die Bestrahlung, sondern vielmehr auf die Rahmenbedingungen des Experiments zurück zu führen. Des Weiteren wurde, nach einer und nach drei Stunden, eine Abnahme in der Spikeanzahl bei den bestrahlten Proben beobachtet. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen ist dies jedoch eher auf temporäre Schwankungen innerhalb der Kulturen zurück zu führen. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Betrachtung der Messergebnisse, die bis zum Versuchsende an Tag 10 nach Bestrahlung durchgeführt wurden (Abbildung 4.12B). Ab dem sechsten Tag nach Bestrahlung ist ein dosisabhängiger Anstieg der Spikeanzahl zu vermerken. Dieser Anstieg ist statistisch gesehen jedoch nicht signifikant und ebenfalls eher auf temporäre Schwankungen innerhalb der Kulturen zurück zu führen.

Des Weiteren wurde überprüft, ob es infolge der Bestrahlung zu einer Veränderung der Amplitudenhöhe kam. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass sich das Adhäsionsverhalten der Zellen auf dem Elektrodenfeld der MEA Chips verändert und sie sich beginnen vom Substrat abzulösen. Vor der Bestrahlung besaßen die Amplituden in den Kontrollen einen durchschnittlichen Wert von $74,93 \mu\text{V} \pm 10,8 \mu\text{V}$, in der mit 1 Gy exponierten Versuchsgruppe $52,88 \mu\text{V} \pm 10,1 \mu\text{V}$ und in den mit 2 Gy bestrahlten Kulturen $40,64 \mu\text{V} \pm 4,1 \mu\text{V}$. Eine signifikante Abweichung von diesem Wert infolge der Bestrahlung wurde nicht nachgewiesen.

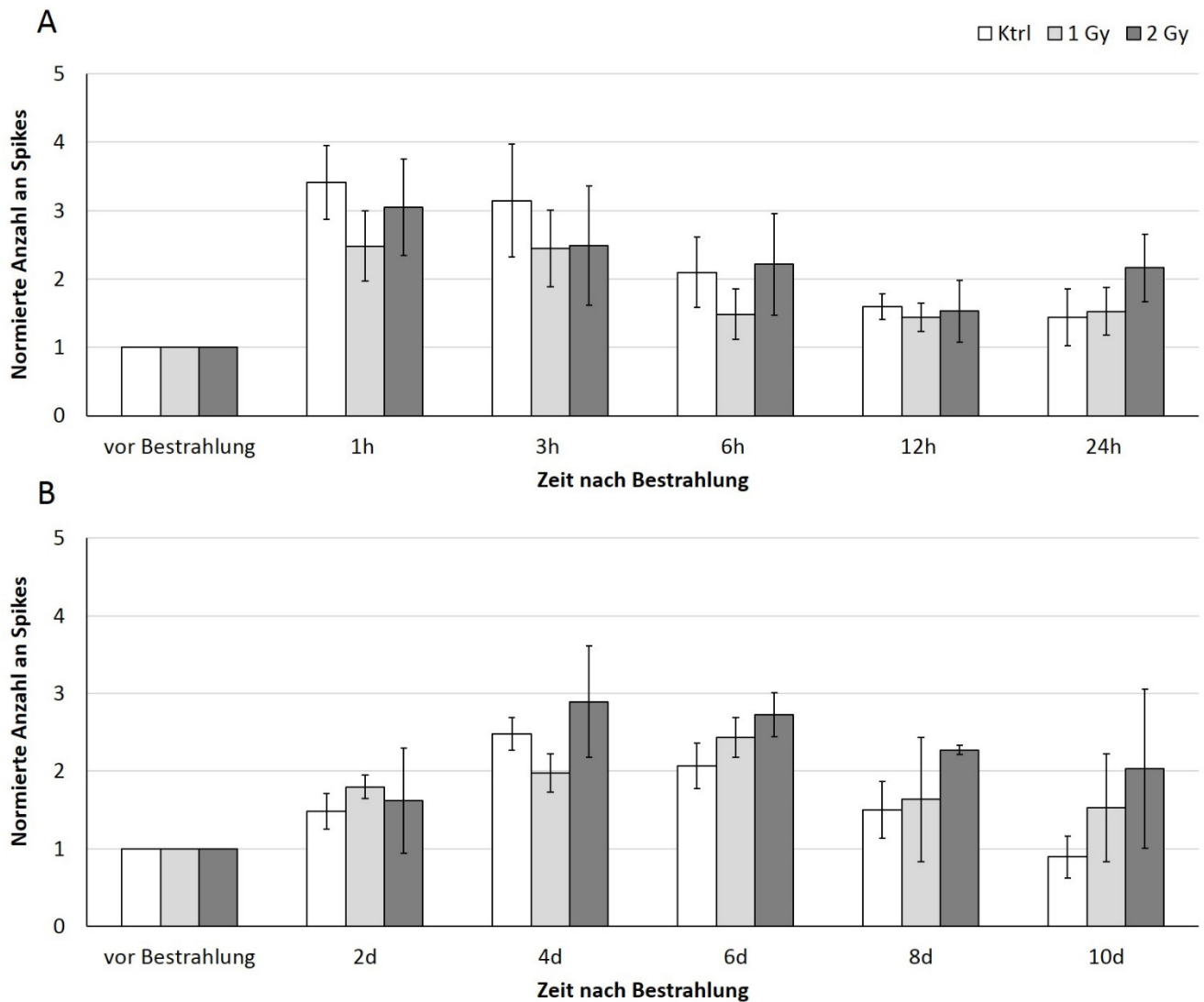


Abbildung 4.12: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl spontan generierter Spikes. Die auf den Wert vor Bestrahlung normierte Anzahl an Spikes pro Minute ist gegen die Zeitpunkte nach der Exposition mit Röntgenstrahlung aufgetragen (Spikes pro Minute vor Bestrahlung: Ktrl: $340,5 \pm 76,2$, 1 Gy: $413 \pm 134,3$, 2 Gy: $206,5 \pm 65,0$). Die Bestrahlung der kortikalen Neurone aus der Ratte wurde an 16 *div* durchgeführt. Die verwendeten Strahlendosen betrugen 1 Gy oder 2 Gy. Sowohl die Ergebnisse der Messungen, die im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgten (A), als auch die Messungen bis zum Ende des Experiments an Tag 10 (B), zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen zwischen den Kontrollen und den bestrahlten Kulturen. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 4$, 1 Gy: $n = 3$, 2 Gy: $n = 4$). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft.

Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Betrachtung der vom Netzwerk generierten Bursts. Vor der Bestrahlung betrug die Anzahl der Bursts pro Minute im Durchschnitt $74,93 \pm 10,8$ in den Kontrollen, $52,88 \pm 10,1$ in der mit 1 Gy exponierten Versuchsgruppe und $40,64 \pm 4,1$ in den mit 2 Gy bestrahlten Kulturen. Abbildung 4.13A zeigt die Messungen, die im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgten und auf die Werte vor der Bestrahlung normiert wurden. Wie bereits bei der Anzahl der Spikes gezeigt wurde, steigt auch die Anzahl der Bursts eine Stunde nach der Bestrahlung an und sinkt im Verlauf von 24 Stunden wieder auf das Anfangsniveau herab. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten und den Kontrollkulturen wurde nicht nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Zunahme der Burstanzahl nicht auf die Bestrahlung, sondern vielmehr auf die Rahmenbedingungen des Experiments zurück zu führen ist. Abbildung 4.13B zeigt die Messungen, die bis zum Versuchsende an Tag 10 nach Bestrahlung durchgeführt wurden. Ab Tag 6 wurde bei den mit 2 Gy exponierten Kulturen eine höhere Anzahl an Bursts detektiert, als bei den Kontrollen und den mit 1 Gy bestrahlten Proben. Dieser Effekt ist statistisch gesehen jedoch nicht signifikant.

Bei der Betrachtung der Burstcharakteristika wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollkulturen und den bestrahlten Proben nachgewiesen. Die Dauer der Bursts vor der Exposition war in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar (Kontrolle: $1,09 \pm 0,2$ s, 1 Gy: $0,79 \pm 0,1$ s, 2 Gy: $1,32 \pm 0,3$ s). Eine strahleninduzierte Modifikation der Burstdauer wurde nicht nachgewiesen. An Tag 10 nach der Bestrahlung hatten die Bursts in den Kontrollen eine Dauer von $1,37 \pm 0,3$ s, in den mit 1 Gy exponierten Kulturen $1 \pm 0,3$ s und in den mit 2 Gy bestrahlten Proben $1,55 \pm 0,1$ s.

Die Anzahl der Spikes pro Burst war in den Versuchsgruppen vor der Bestrahlung ebenfalls vergleichbar (Kontrolle: $6,41 \pm 0,3$, 1 Gy: $6,39 \pm 0,5$, 2 Gy: $6,05 \pm 0,6$). Eine Exposition mit Röntgenstrahlung hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter. Am Versuchsende an Tag 10 nach der Bestrahlung bestanden die Bursts in den Kontrollkulturen im Durchschnitt aus $7,17 \pm 0,3$ Spikes, in den mit 1 Gy exponierten Kulturen aus $6,57 \pm 0,5$ Spikes und in den mit 2 Gy bestrahlten Proben aus $6,88 \pm 0,9$ Spikes.

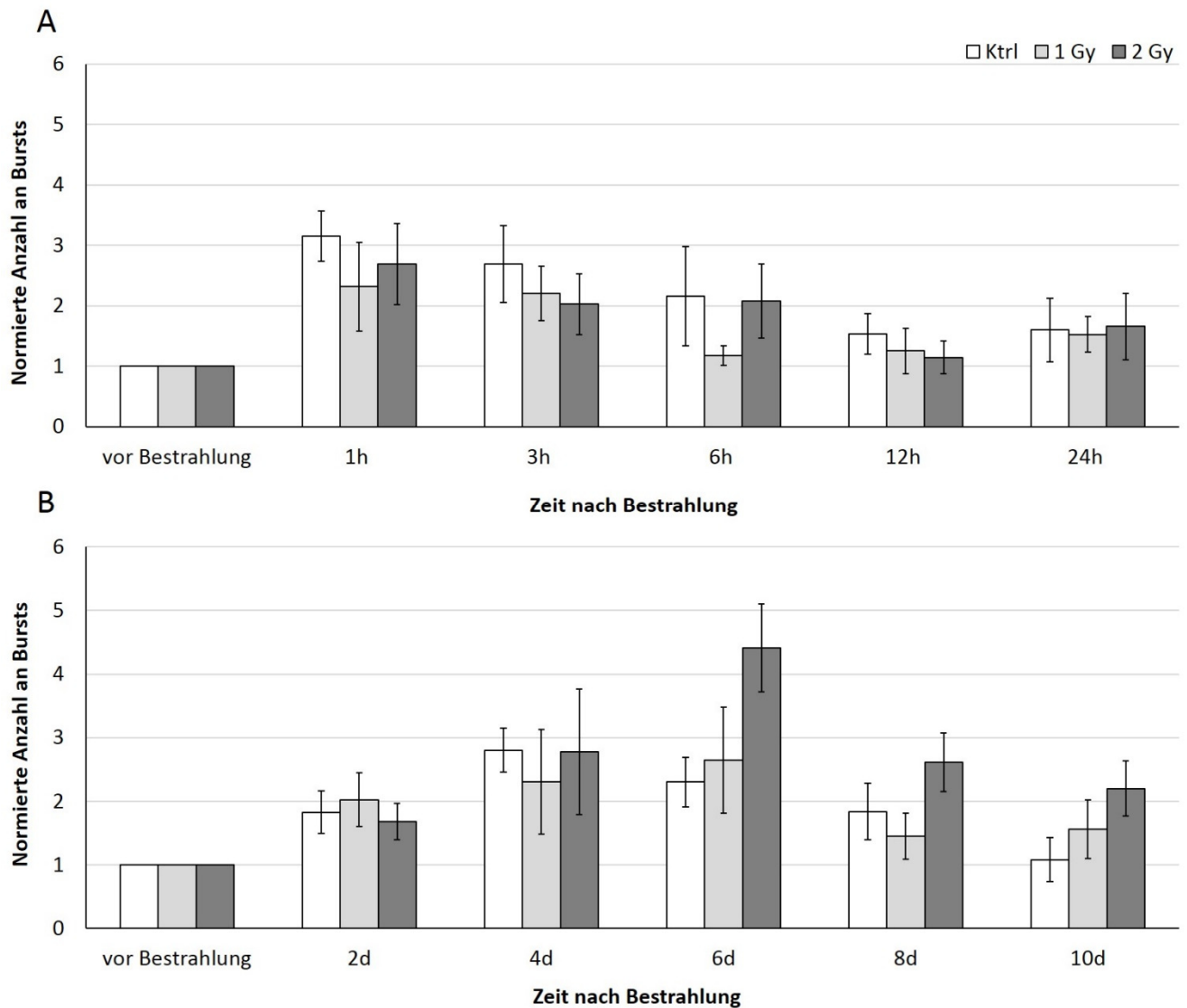


Abbildung 4.13: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl spontan generierter Bursts.

Die auf den Wert vor Bestrahlung normierte Anzahl an Bursts pro Minute ist gegen die Tage nach der Exposition mit Röntgenstrahlung aufgetragen (Bursts pro Minute vor Bestrahlung: Ktrl: $74,93 \pm 10,8$, 1 Gy: $52,88 \pm 10,1$, 2 Gy: $40,64 \pm 4,1$). Die Bestrahlung der kortikalen Neurone aus der Ratte wurde an 16 *div* durchgeführt. Die verwendeten Strahlendosen betrugen 1 Gy oder 2 Gy. Sowohl die Ergebnisse der Messungen, die im Laufe der ersten 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgten (A), als auch die Messungen bis zum Ende des Experimentes an Tag 10 (B), zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen in der Anzahl der generierten Bursts zwischen den Kontrollen und den bestrahlten Kulturen. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 4$, 1 Gy: $n = 3$, 2 Gy: $n = 4$). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft.

Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters

Das elektrische Aktivitätsmuster eines ausgereiften neuronalen Netzwerks *in vitro* wird in der Regel von synchronen Bursts dominiert. Um zu überprüfen, ob eine Exposition mit Röntgenstrahlung einen Einfluss auf die zunehmende Synchronität der Signale hat, wurde das Aktivitätsmuster der Rattenneurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung analysiert. Abbildung 4.14 zeigt dieses Aktivitätsmuster zum Zeitpunkt vor der Exposition, sowie 1 Stunde und 10 Tage nach Bestrahlung in Form eines Rasterplots. Bereits vor der Röntgenbestrahlung bestand das Aktivitätsmuster aus Bursts, die simultan an mehreren Elektroden auftraten. 1 Stunde nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy hat sich dieses Muster nicht verändert. Jedoch wurde ein Anstieg in der Anzahl der generierten Signale, wie es zuvor bereits beschrieben wurde, sichtbar. 10 Tage nach der Exposition hat sich ein Aktivitätsmuster entwickelt, das von synchronen Bursts dominiert wird und das vergleichbar ist mit demjenigen der Kontrollkulturen (Vergleiche Abbildung 4.8). Die Exposition mit Röntgenstrahlung hat die Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters nicht beeinflusst.

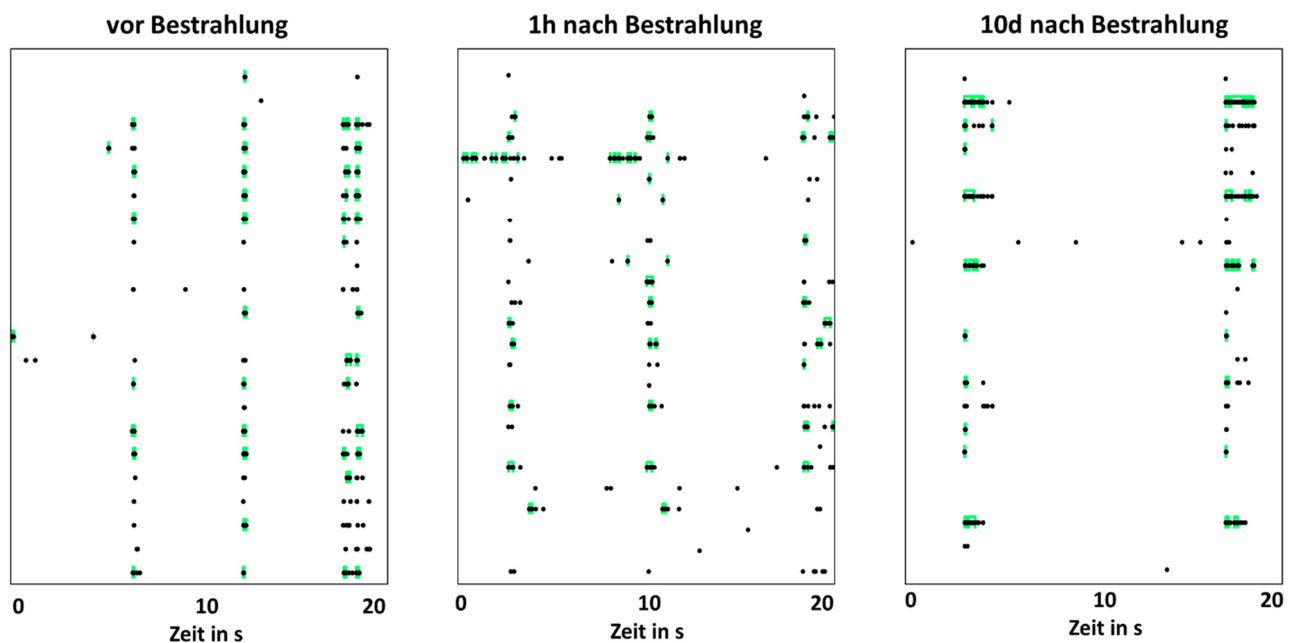


Abbildung 4.14: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf das elektrische Aktivitätsmuster von Neurosphären. Das elektrische Aktivitätsmuster einer Kultur wurde vor der Bestrahlung, sowie 1 Stunde und 10 Tage nach der Exposition mit Röntgenstrahlung der Dosis 1 Gy aufgezeichnet und ist hier in Form eines Rasterplots dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder einzelne Strich einen Spike und jeder dickere, grün markierte Balken einen Burst. Dargestellt ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Da die Entwicklung der individuellen Kulturen vergleichbar war, ist hier nur eine Messung exemplarisch dargestellt. Bereits vor der Exposition sind Burst Ereignisse zu erkennen, die simultan an mehreren Elektroden auftreten. 10 Tage nach der Bestrahlung hat sich ein Aktivitätsmuster ausgebildet, das von synchronen Bursts dominiert wird. Die Exposition mit Röntgenstrahlung hat die Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters nicht beeinflusst.

4.3. Charakterisierung der Neurosphären

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dargestellt, die mit den aus hESC differenzierten NS erzielt wurden.

4.3.1. Immunhistochemische Charakterisierung

hESC wurden zunächst zu NSC differenziert und in eine Suspensionskultur überführt, in der sie zu NS reaggregierten. Die einzelnen Schritte des Differenzierungsprotokolls, sowie repräsentative Bilder der hESC, NSC und NS sind in Abbildung 4.15A-C dargestellt. Um den Phänotyp der hESC, NSC und NS zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 4.15D-F). Die Färbungen bestätigen die nukleäre Präsenz der Pluripotenzmarker OCT4 und SOX2 in den hESC (Abbildung 4.15D). Die NSC wurden ebenfalls auf das Vorhandensein des Pluripotenzmarkers SOX2 untersucht. Auch in diesem Fall ist eine nukleäre Expression des Proteins zu erkennen. Zusätzlich wurde in den NSC Nestin positive Intermediärfilamente nachgewiesen (Abbildung 4.15E). Die Bildung der NS wurde sieben Tage nach Initiierung der NSC eingeleitet. Hierfür wurden die NSC enzymatisch dissoziiert und in eine Suspensionskultur überführt, in der sie zu dreidimensionalen NS reaggregierten. Diese besitzen nach 14 Tagen einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa $274 \pm 119 \mu\text{m}$. Antikörperfärbungen gegen das Protein β -III Tubulin zeigen, dass postmitotische Neurone aus den NS migrieren (Abbildung 4.15F).

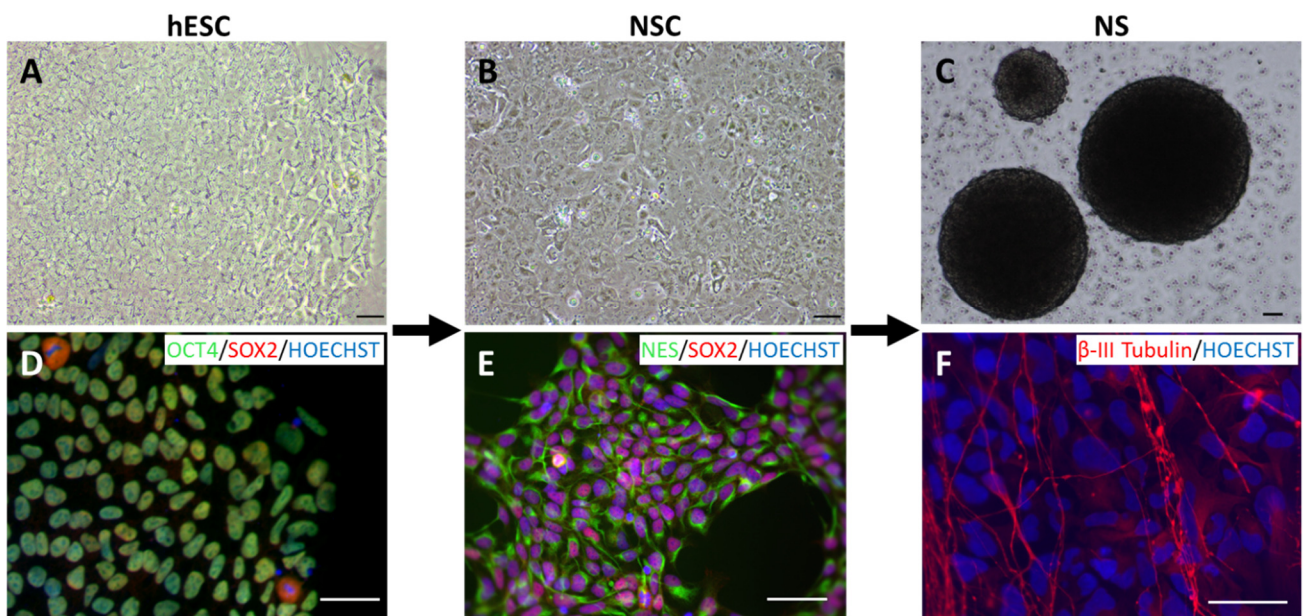


Abbildung 4.15: Differenzierungsprotokoll von humanen embryonalen Stammzellen zu Neurosphären. hESC wurden auf *Geltrex* kultiviert (A) und zu NSC differenziert (B). Nach sieben Tagen wurden die NSC enzymatisch dissoziiert und in eine Suspensionskultur überführt, in der sie zu dreidimensionalen NS reaggregierten (C). Der Phänotyp der jeweiligen Differenzierungsstadien wurde durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Diese bestätigen die nukleäre Expression der Pluripotenzmarker OCT4 (grün) und SOX2 (rot) in den hESC (D). Der Phänotyp der NSC wurde durch die Expression von SOX2 (rot) und Nestin (grün) bestätigt (E). Antikörperfärbungen gegen das Protein β -III Tubulin zeigen, dass postmitotische Neurone aus den NS migrieren (F). Bei allen hier gezeigten Antikörperfärbungen wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst (blau) angefärbt. Maßstabsbalken = $50 \mu\text{m}$. Modifizierte Abbildung nach [97].

4.3.2. Elektrophysiologische Charakterisierung

Im Gegensatz zu den kortikalen Neuronen aus der Ratte, gab es bei den NS deutliche Variationen bezüglich des Auftretens der ersten elektrischen Signale. Diese wurden im Laufe der ersten Woche nach der Aussaat detektiert. Bei Kulturen, bei denen in diesem Zeitraum keine elektrische Aktivität detektiert wurde, stellte sich eine spontane Signalgenerierung auch nicht mehr ein. In diesem Kapitel werden die Zeitangaben daher nicht in Tagen *in vitro* festgehalten, sondern in Tage elektrischer Aktivität. Tag 1 bedeutet in diesem Fall der Tag, an dem die ersten elektrischen Signale detektiert wurden, unabhängig davon, wie lange die NS bereits auf dem MEA Chip kultiviert wurden. Trotz der deutlichen Variationen bezüglich des Auftretens der elektrischen Signale zwischen den individuellen Kulturen, ist die Entwicklung des Aktivitätsmusters innerhalb der ersten 10 Tage der elektrischen Aktivität miteinander vergleichbar. An den darauffolgenden Tagen wurde kein einheitliches Aktivitätsmuster mehr beobachtet und letztendlich kam es zur Ablösung der NS von den MEA Chips. Daher wird in den nachfolgenden Kapiteln die Entwicklung des Aktivitätsmusters nur von Tag 1 bis Tag 10 der elektrischen Aktivität dargestellt.

Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Die ersten elektrischen Signale wurden im Laufe der ersten Woche nach Aussaat der NS auf den MEA Chips detektiert. Wie es bereits bei den kortikalen Rattenneuronen beobachtet wurde, variiert der Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität auch bei den NS. In Abbildung 4.16 ist die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen in Prozent über einen Zeitraum von 22 Tagen dargestellt. Bis Tag 6 der elektrischen Aktivität wurden bei 100 % der NS elektrische Signale detektiert. Ab Tag 7 beginnen die ersten Kulturen ihre spontane Signalgenerierung einzustellen und die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen sinkt bis an Tag 11 auf einen Wert von 55 %. In der darauffolgenden Woche verringert sich die Anzahl kontinuierlich. An Tag 19 wurden noch bei 40 % der Kulturen elektrische Signale detektiert. Diese Kulturen stellten an Tag 20 ihre spontane Signalgenerierung ein.

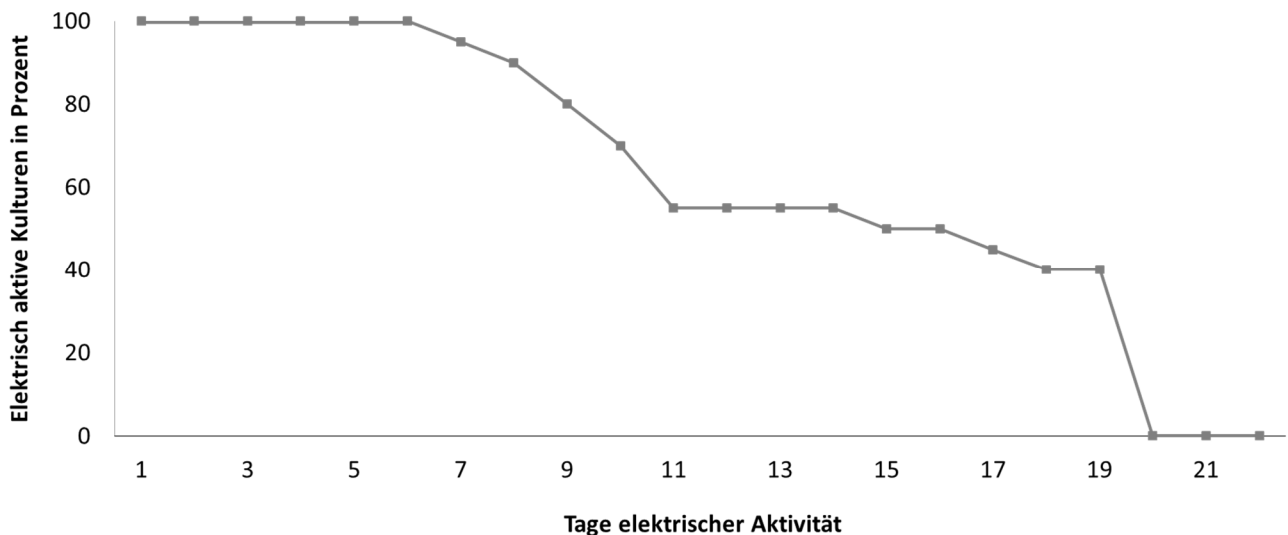


Abbildung 4.16: Zeitraum elektrischer Aktivität von Neurosphären. Die Anzahl der elektrophysiologisch aktiven Kulturen ist prozentual gegen die Tage der elektrischen Aktivität aufgetragen. Ab Tag 7 beginnen die ersten von anfangs 21 Kulturen ihre spontane Signalgenerierung einzustellen. Bis Tag 11 sinkt der prozentuale Anteil elektrisch aktiver Kulturen auf 55 %. An den darauffolgenden Tagen verringert sich die Anzahl kontinuierlich. An Tag 19 wurden noch bei 40 % der Kulturen elektrische Signale detektiert. Diese stellen an Tag 20 ihre spontane Signalgenerierung ein. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten mit insgesamt 21 Kulturen.

Anzahl aktiver Elektroden

Die Anzahl der aktiven Elektroden gibt Aufschluss über die flächige Verteilung der Neurone auf dem Elektrodenfeld, sowie deren Fähigkeit spontane elektrische Signale zu generieren. Im Gegensatz zu den kortikalen Rattenneuronen, wurde bei der Aussaat der NS nicht das gesamte Elektrodenfeld bedeckt, sondern lediglich die Elektroden, auf denen die NS platziert wurden (Abbildung 4.17A). Bei einer durchschnittlichen Fläche von $0,66 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ (vgl. Kapitel 4.4.2) waren dies in der Regel 4–6 Elektroden. An diesen Elektroden wurden die ersten elektrischen Signale der NS detektiert ($5,25 \pm 0,6$ aktive Elektroden an Tag 1 der elektrischen Aktivität). Bereits ein Tag nach der Aussaat wurden Zellen und Neurite beobachtet, die radial aus der NS migrierten. Im Laufe der Kultivierung nahmen sowohl die Zelldichte, als auch die Auswuchsweite der Neurite über das Elektrodenfeld zu. Abbildung 4.17 veranschaulicht dies an Tag 1 (B), Tag 4 (C) und Tag 10 (D) nach Aussaat der NS auf die MEA Chips. Während die Zellen und Neurite über das Elektrodenfeld migrieren, bedecken sie immer mehr Elektroden, so dass die Anzahl der aktiven Elektroden ansteigt (Abbildung 4.17E). Im Laufe der ersten Woche nach Detektion der initialen Signale verdoppelte sich die Anzahl der aktiven Elektroden. An Tag 9 hatte sich der Wert beinahe verdreifacht.

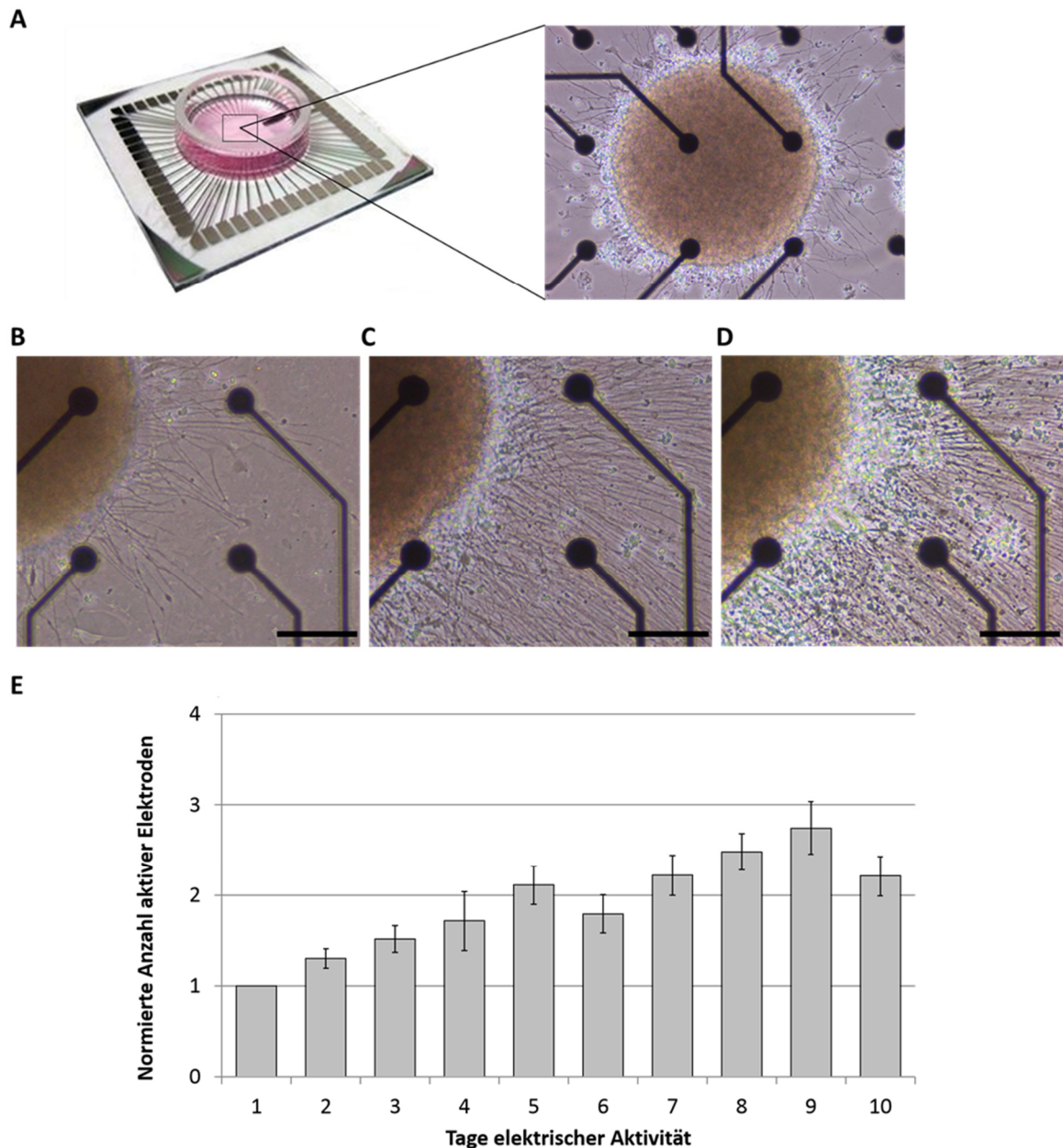


Abbildung 4.17: Entwicklung der Anzahl aktiver Elektroden im Laufe der Kultivierung. NS wurden auf dem Elektrodenfeld der MEA Chips kultiviert, um ihre electrophysiologischen Eigenschaften zu untersuchen (A). Im Laufe der Kultivierung migrieren Neurone und Neurite radial aus der NS. Die hier gezeigten Abbildungen wurden an Tag 1 (B), Tag 4 (C) und Tag 10 (D) nach Aussaat der NS aufgenommen. Dies führt zu einem Anstieg der Anzahl aktiver Elektroden (E). Die Anzahl der aktiven Elektroden wurde auf den ersten Tag der elektrischen Aktivität normiert ($5,25 \pm 0,6$ aktive Elektroden an Tag 1). Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=21$). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft. Modifizierte Abbildung nach [97].

Elektrophysiologische Entwicklung

Bei den ersten elektrischen Signalen der NS handelte es sich sowohl um negative und positive monophasische, als auch biphasische Spikes. Abbildung 4.18A zeigt eine repräsentative Messung der neuronalen Aktivität an einer Elektrode über einen Zeitraum von 2 s. Hierbei sind Spikes mit einem grünen und der Beginn, sowie das Ende des Bursts, mit einem gelben Pfeil markiert. Es wird deutlich, dass sich die detektierten Spikes bezüglich der Amplitudenhöhe von denjenigen der kortikalen Rattenneurone unterscheiden. Während sich die Werte bei den Rattenneuronen durchschnittlich im Bereich von -50 - $-100 \mu V$ befanden, wiesen die NS eine durchschnittliche Amplitudenhöhe von $20,27 \mu V \pm 1,1 \mu V$ auf. Auf die dadurch resultierende Problematik bei der Spike Detektion wurde in Kapitel 3.3.5 näher eingegangen.

Die Anzahl der Spikes pro Minute am ersten Tag der elektrischen Aktivität betrug $565,75 \pm 128,1$ und diejenige der Bursts $45,69 \pm 16,7$. Sowohl die Anzahl der Spikes, als auch der Bursts nahm im Laufe der Kultivierungszeit zu (Abbildung 4.18B-C). Bis zum zehnten Tag der elektrischen Aktivität hat sich die Anzahl der detektierten Spikes um das Fünffache und die Anzahl der Bursts um das Zwanzigfache erhöht. Die Höhe der Spikeamplituden, sowie die Anzahl der Spikes pro Burst ($4,41 \pm 0,3$ Spikes pro Burst an Tag 1 der elektrischen Aktivität) blieben im Laufe der Kultivierungszeit konstant (Abbildung 4.18D-E).

Ein typisches Aktivitätsmuster der NS an Tag 10 der elektrischen Aktivität ist in Abbildung 4.18F in Form eines Rasterplots dargestellt. Es wird deutlich, dass das Aktivitätsmuster aus einer hohen Anzahl an Spikes und Bursts besteht, wobei letztere nur selten synchron an mehreren Elektroden detektiert wurden.

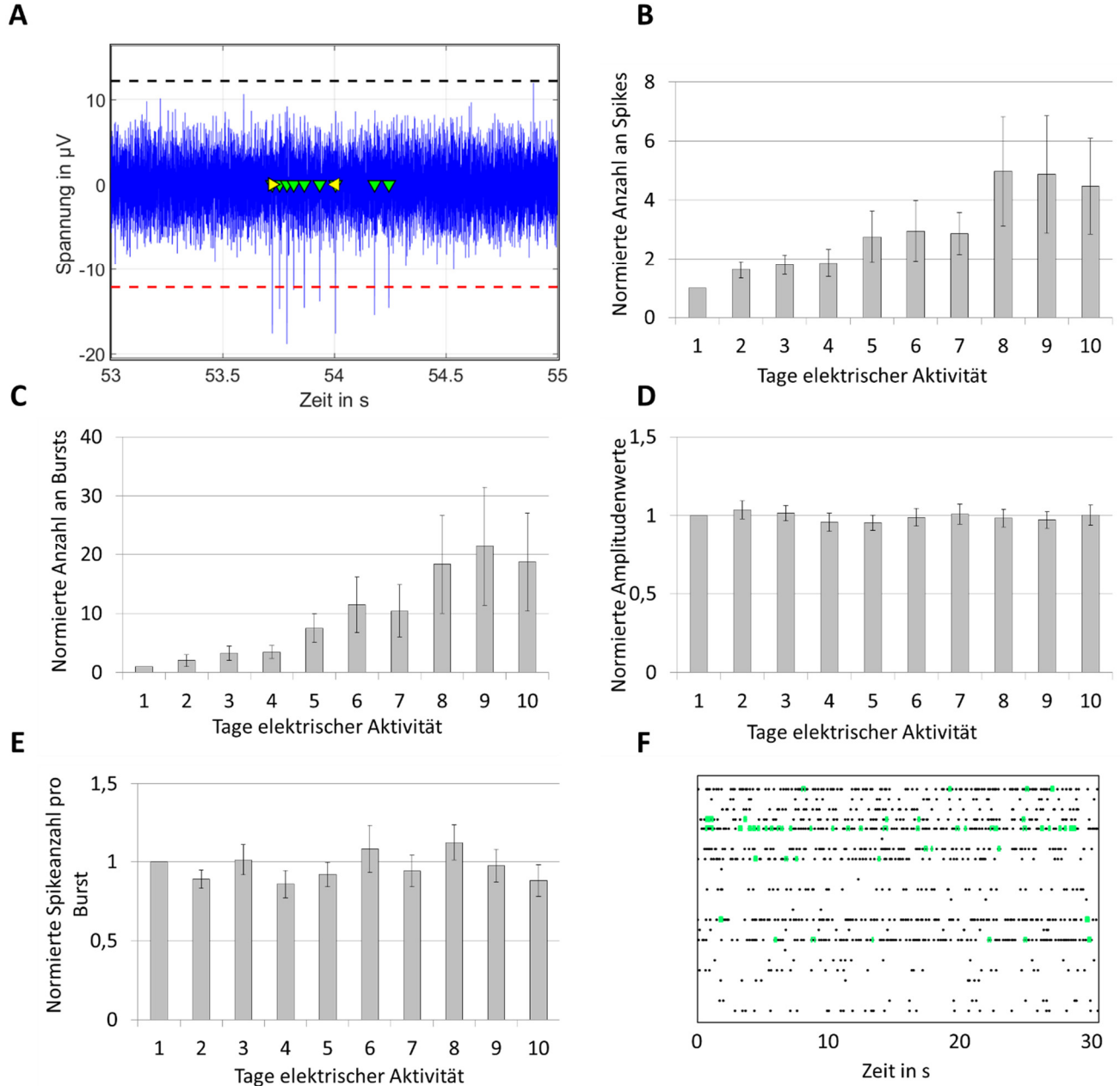


Abbildung 4.18: Entwicklung der electrophysiologischen Eigenschaften von Neurosphären. Die neuronale Aktivität der NS wurde mittels MEA Chips detektiert und über einen Zeitraum von 10 Tagen analysiert. Repräsentative Messung einer Elektrode an Tag 1, in der Spikes mit grünen und Bursts mit gelben Pfeilen markiert sind (A). Im Laufe der ersten 10 Tage elektrischer Aktivität nimmt die Anzahl der Spikes um das Fünffache zu ($565,75 \pm 128,1$ Spikes pro Minute an Tag 1) (B) und die Anzahl der Bursts um das Zwanzigfache ($45,69 \pm 16,7$ Bursts pro Minute an Tag 1) (C). Weitere Parameter wie die Amplitudenhöhe ($20,27 \mu\text{V} \pm 1,1 \mu\text{V}$ an Tag 1) (D), sowie die Anzahl der Spikes pro Burst ($4,41 \pm 0,3$ Spikes pro Burst an Tag 1) (E) bleiben in diesem Zeitraum konstant. An Tag 10 der elektrischen Aktivität sind, bei Betrachtung des Aktivitätsmusters im Rasterplot, eine hohe Anzahl an Spikes und zeitlich nicht synchronisierter Bursts zu erkennen (F). Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 21$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Modifizierte Abbildung nach [97].

Entwicklung der Netzwerkaktivität

Ein generelles Merkmal neuronaler Netzwerke *in vitro* ist die Entwicklung eines Aktivitätsmusters, das von synchronen Burst Ereignissen dominiert wird. Im Gegensatz zu den kortikalen Rattenneuronen, wurde solch eine Entwicklung bei den NS nicht beobachtet. Das Aktivitätsmuster einer NS an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 der elektrischen Aktivität ist in Abbildung 4.19 in Form eines Rasterplots dargestellt. Am ersten Tag sind einzelne, spontan auftretende Spikes zu erkennen. An Tag fünf wurden zusätzlich Bursts detektiert (in grün markiert). Bis zum zehnten Tag der elektrischen Aktivität hat sich sowohl die Anzahl der Spikes, als auch die Anzahl der Bursts erhöht. Ein simultanes Auftreten der Bursts an mehreren Elektroden wurde in den Kulturen jedoch nur selten beobachtet.

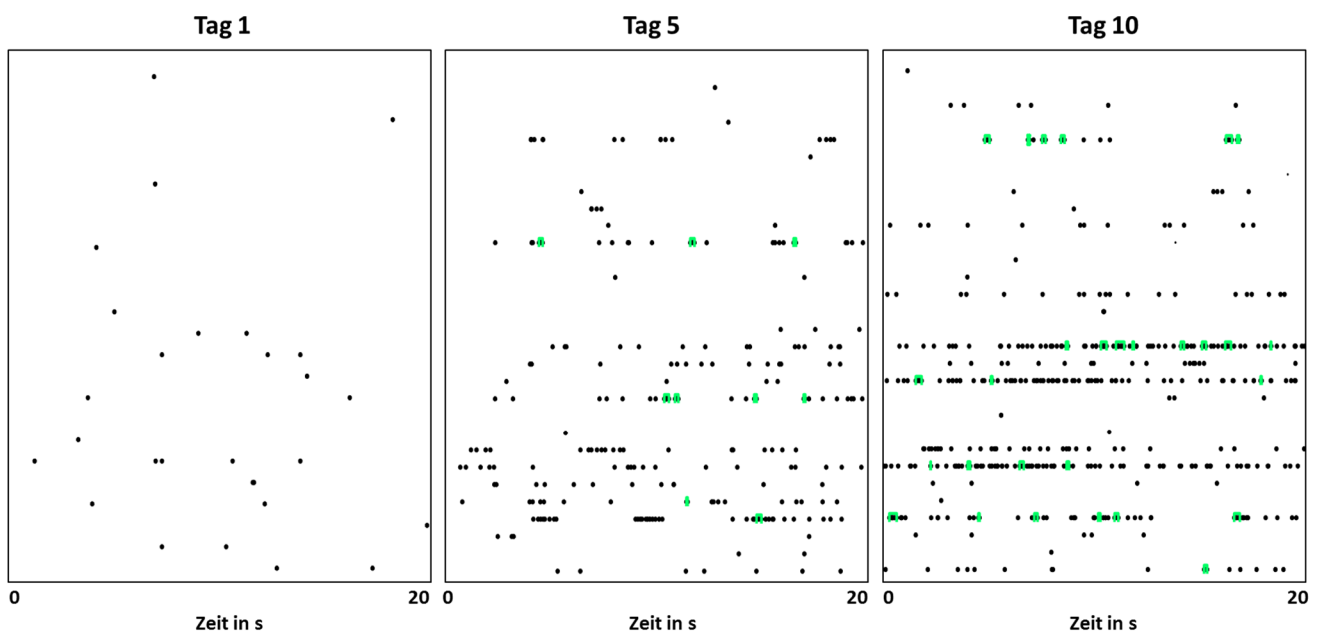


Abbildung 4.19: Entwicklung der Netzwerkaktivität einer Neurosphäre. Die elektrische Aktivität einer NS wurde an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 der elektrischen Aktivität aufgezeichnet und ist hier in Form eines Rasterplots dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder einzelne Strich einen Spike und jeder dickere, grün markierte Balken einen Burst. Dargestellt ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Da die Entwicklung der individuellen Kulturen vergleichbar war, ist hier nur eine Messung exemplarisch dargestellt. Am ersten Tag sind vereinzelte Spikes zu erkennen. An Tag 5 wurden zusätzlich Bursts detektiert. Am zehnten Tag hat sich sowohl die Anzahl der Spikes, als auch die Anzahl der Bursts erhöht. Ein simultanes Auftreten der Bursts an mehreren Elektroden wurde jedoch nur selten beobachtet.

4.3.3. Pharmakologische Untersuchungen an Neurosphären

Um die elektrische Reaktion der NS auf Substanzen zu überprüfen, die eine Modifikation des Aktivitätsmusters herbeiführen, sowie um die Präsenz von GABA_A-Rezeptoren zu untersuchen, wurden sie mit Bicucullin und Carbamazepin behandelt. Zur Analyse der Netzwerkantwort wurden als Parameter die Anzahl der Spikes, die Anzahl aktiver Elektroden, die Anzahl der Spikes pro Burst, sowie das simultane Auftreten der Bursts herangezogen. Vor Applikation der Substanzen wurde jeweils eine Messung zur Bestimmung der nativen Netzwerkaktivität durchgeführt. Die modifizierten Änderungen des Aktivitätsmusters durch die verabreichten Substanzen wurden auf diese native Aktivität normiert.

Modifikation der Netzwerkaktivität durch Carbamazepin

Carbamazepin ist eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Antikonvulsiva und das Mittel erster Wahl bei Epilepsie fokalen Ursprungs [98]. Die Wirkung erfolgt über die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle.

Abbildung 4.20 zeigt den Einfluss einer akuten Exposition mit Carbamazepin auf das elektrische Aktivitätsmuster der NS. Vor Applikation der Substanz bestand das Aktivitätsmuster aus einer schnellen Abfolge individueller Spikes und Bursts (Abbildung 4.20A, linke Seite). Direkt nach Applikation der Substanz verringerte sich die spontane Signalgenerierung und kam nachfolgend vollständig zum Erliegen (Abbildung 4.20A, rechte Seite). Die Betrachtung der Netzwerkaktivität im Rasterplot zeigt, dass Elektroden, die vor der Applikation nur eine geringe Anzahl elektrischer Signale detektierten, direkt nach Zugabe von Carbamazepin keine Spikes mehr erfassten. Bei Elektroden mit einer hohen Spikedichte trat dieser Effekt spätestens nach 15 s ein (Abbildung 4.20B). Die quantitative Analyse der Messungen zeigt, dass eine Minute nach Applikation von Carbamazepin weder aktive Elektroden vorhanden waren (Abbildung 4.20C), noch elektrische Signale in Form von Spikes (Abbildung 4.20D) oder Bursts (Abbildung 4.20E) detektiert wurden. Dieser Effekt war nicht reversibel. Auch nach mehrmaligem Waschen der Kultur mit frischem Medium setzte die spontane Signalgenerierung nicht wieder ein.

Um einen Einfluss des verwendeten Lösemittels DMSO auszuschließen, wurde eine Kultur mit der entsprechenden Konzentration an DMSO behandelt und als Kontrollprobe betrachtet. In Abbildung 4.20C – E ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl aktiver Elektroden, sowie die Anzahl der Spikes und Bursts Schwankungen unterworfen sind, die Werte jedoch weitestgehend konstant blieben. Ein Einfluss des Lösemittels kann somit ausgeschlossen werden.

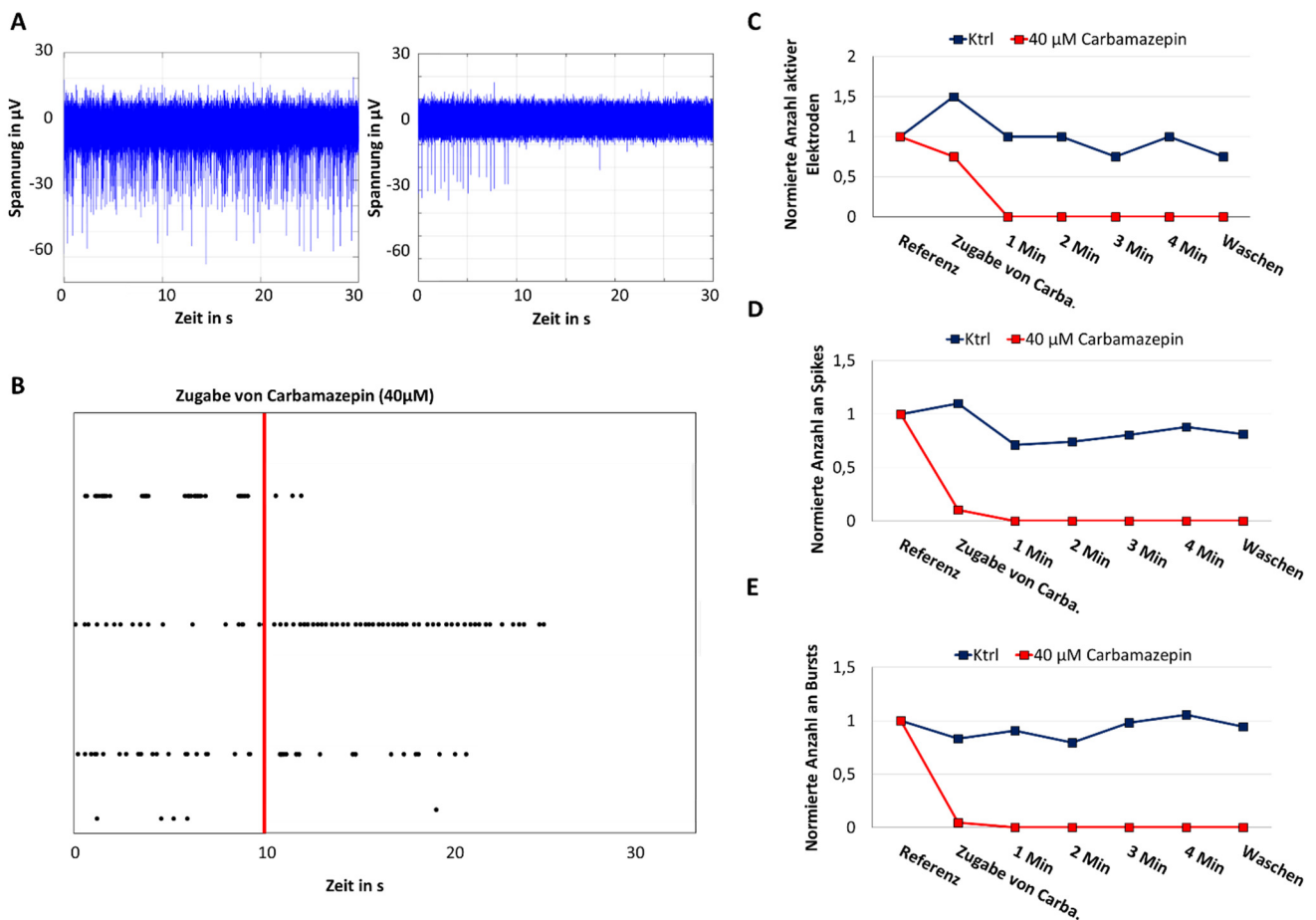


Abbildung 4.20: Elektrophysiologische Reaktion der Neurosphären auf die Applikation von Carbamazepin. Messung der neuronalen Aktivität der NS an Tag 19 an einer Elektrode vor Zugabe von Carbamazepin (A, linke Seite). Die Applikation von Carbamazepin resultiert in einer kontinuierlichen Verringerung der detektierten Spikes bis hin zu einer kompletten Stilllegung der spontanen Signalgenerierung (A, rechte Seite). Die Betrachtung der Netzwerkaktivität in Form eines Rasterplots zeigt, dass spätestens 15 Sekunden nach Applikation von Carbamazepin keine Spikes mehr detektiert werden (B). 1 Minute nach Zugabe von Carbamazepin sind keine aktiven Elektroden (C), keine Spikes (D) und keine Bursts (E) mehr nachweisbar (Vor Applikation: Ktrl: 3 aktive Elektroden, 836 Spikes und 66 Bursts pro Minute, 40 µM Carbamazepin: 4 aktive Elektroden, 1229 Spikes und 132 Bursts pro Minute). Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde 1 Kultur mit Carbamazepin (40 µM) und 1 Kultur mit DMSO (Kontrolle) behandelt.

Modifikation der Netzwerkaktivität durch Bicucullin

Bicucullin wird bei therapeutischen Verfahren nicht eingesetzt, übernimmt jedoch als kompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors eine wichtige Rolle in der experimentellen Pharmakologie [99]. Bindet Bicucullin am GABA_A-Rezeptor, so wird die Entstehung hyperpolarisierender Potentiale inhibiert, indem die Leitfähigkeit der Membran für Chlorid-Ionen gesenkt wird [100]. Als Folge kommt es zu einer Enthemmung der neuronalen Netzwerkaktivität. Um die Präsenz von GABA_A-Rezeptoren in den NS zu überprüfen, wurden sie mit 10 µM Bicucullin behandelt und das dadurch modifizierte Aktivitätsmuster analysiert.

Vor Applikation von Bicucullin bestand das Aktivitätsmuster aus einer schnellen Abfolge individueller Spikes (Abbildung 4.21A). Die Anzahl der Spikes pro Minute war bei den beiden analysierten Kulturen vergleichbar (Chip 1: $3629,67 \pm 509,3$ Spikes pro Minute, Chip 2: $3374 \pm 1183,6$ Spikes pro Minute). Direkt nach Applikation veränderte sich das Aktivitätsmuster (Abbildung 4.21B). In beiden Kulturen wurde 1 Minute nach Applikation eine erhöhte Anzahl an Spikes detektiert (Chip 1: 5725 Spikes pro Minute, Chip 2: 6288 Spikes pro Minute). Während sich die Anzahl der Spikes bei Chip 1 nach 5 Minuten wieder reduzierte (3811 Spikes pro Minute), erhöhte sich die Spikeanzahl bei Chip 2 weiter (6932 Spikes pro Minute). Nach 15 Minuten hatte sich die Aktivität in beiden Kulturen der Referenzmessung vor Applikation angenähert (Abbildung 4.21C). Die elektrischen Signale wurden auch von Elektroden detektiert, die zuvor keine Spikes erfassten, sodass nach Applikation von Bicucullin eine erhöhte Anzahl aktiver Elektroden nachgewiesen wurde. Vor Applikation war die Anzahl der aktiven Elektroden in den beiden behandelten Kulturen vergleichbar (Chip 1: 11 aktive Elektroden, Chip 2: 16 aktive Elektroden). Direkt nach Applikation von Bicucullin erhöhte sich dieser Wert bei beiden Kulturen (Chip 1: 18 aktive Elektroden, Chip 2: 24 aktive Elektroden). Während sich dieser Wert 15 Minuten nach Applikation bei Chip 1 nicht verändert hat (18 aktive Elektroden), reduzierte er sich bei Chip 2 (17 aktive Elektroden). Nach einem Waschschrift detektierten 7 Elektroden bei Chip 1 und 18 Elektroden bei Chip 2 Spikes (Abbildung 4.21D).

Des Weiteren wurde das Aktivitätsmuster nach Applikation von Bicucullin von deutlich erkennbaren Bursts dominiert, die synchron an unterschiedlichen Elektroden auftraten. Um das Auftreten dieser Netzwerkbursts zu analysieren, wurde ein Algorithmus verwendet, der auf den Arbeiten von Chiappalone et al. basiert [93]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21E dargestellt. Vor Zugabe von Bicucullin wurden keine Netzwerkbursts detektiert. Nach Applikation der Substanz traten diese etwa 3 Mal pro Minute auf. Dieses modifizierte Aktivitätsmuster war für etwa 10 Minuten sichtbar. Nach dieser Zeit traten die Netzwerkbursts immer seltener auf und das Aktivitätsmuster glich sich, nach einem Waschschrift, wieder der nativen Netzwerkaktivität an.

Um einen Einfluss des Lösemittels PBS auszuschließen, wurden 2 Kulturen mit der entsprechenden Konzentration an PBS behandelt und als Kontrolle mitgeführt. In Abbildung 4.21C, D ist zu erkennen, dass sowohl die Anzahl der Spikes, als auch die Anzahl aktiver Elektroden in den Kontrollen starken Schwankungen unterworfen sind. Die Werte blieben jedoch weitestgehend konstant. Ein Einfluss des Lösemittels kann folglich ausgeschlossen werden.

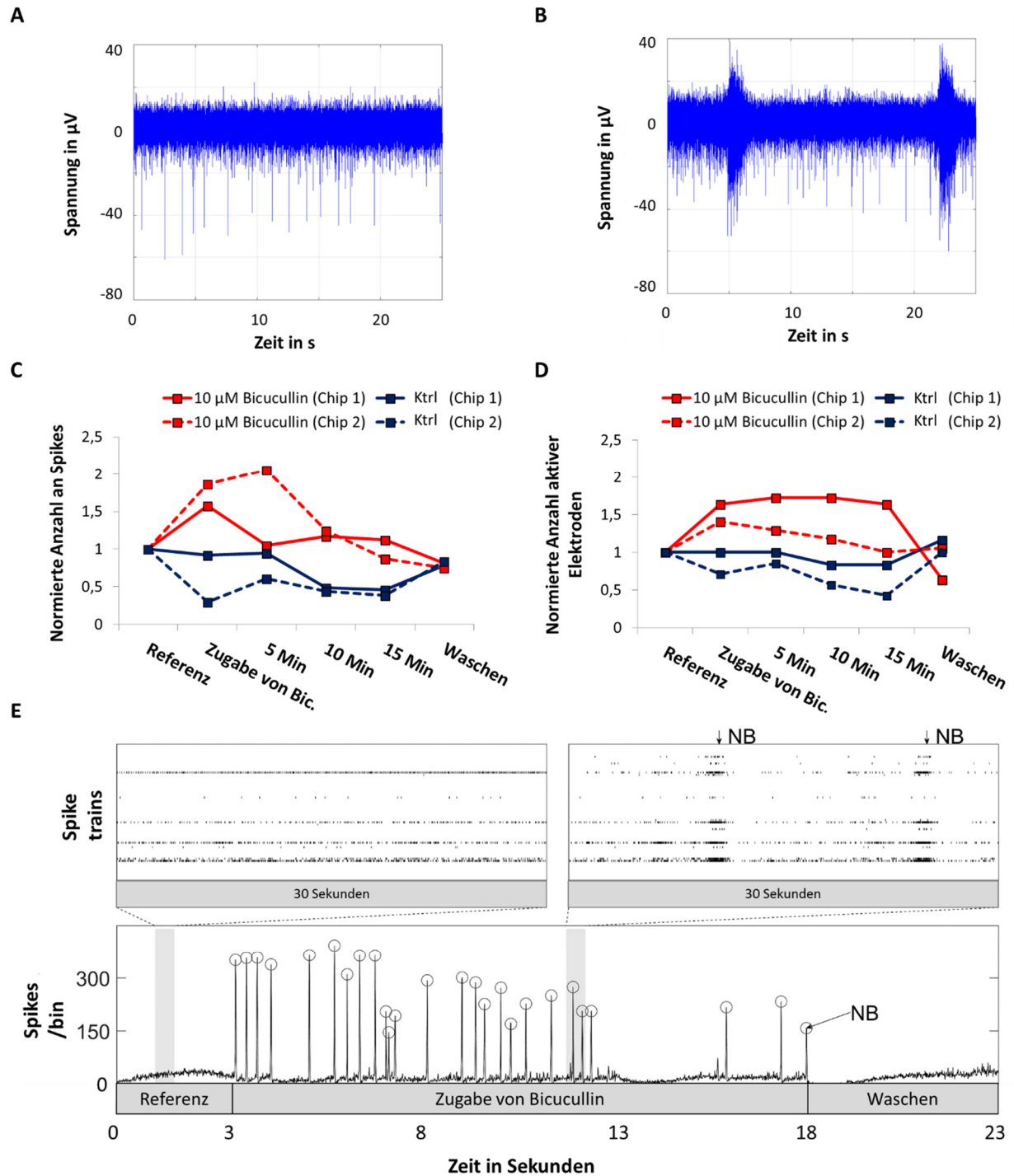


Abbildung 4.21: Elektrophysiologische Reaktion der Neurosphären auf die Applikation von Bicucullin. Messung der neuronalen Aktivität der NS an Tag 19 an einer Elektrode vor Zugabe von Bicucullin (A). Die Applikation der Substanz resultiert in einem modifizierten Aktivitätsmuster (B). Sowohl die Anzahl der detektierten Spikes (C), als auch die Anzahl der aktiven Elektroden (D) erhöhte sich nach Zugabe von Bicucullin (vor Applikation: Ktrl Chip 1: 6 aktive Elektroden, $1403 \pm 196,3$ Spikes pro Minute; Ktrl Chip 2: 5 aktive Elektroden, $2323,33 \pm 518,9$ Spikes pro Minute; Bicucullin Chip 1: 11 aktive Elektroden, $3629,67 \pm 509,3$ Spikes pro Minute; Bicucullin Chip 2: 16 aktive Elektroden, $3374 \pm 1183,6$ Spikes pro Minute). Des Weiteren traten Netzwerkbursts an unterschiedlichen Elektroden auf (E). Das durch Bicucullin modifizierte Aktivitätsmuster blieb etwa 15 Minuten lang bestehen und näherte sich nach einem Waschschriff wieder dem nativen Aktivitätsmuster an. Für die hier gezeigten Ergebnisse wurden 2 Kulturen mit Bicucullin ($10 \mu\text{M}$) und 2 Kulturen mit PBS (Kontrolle) behandelt.

4.4. Untersuchungen der Neurosphären, die auf mit Röntgenstrahlung exponierten hESC basieren

4.4.1. Elektrophysiologische Eigenschaften

Dieses Zellkulturmodell wurde verwendet, um eine *in utero* Exposition mit ionisierender Strahlung zu imitieren. Dafür wurden hESC mit Röntgenstrahlen exponiert und die überlebenden Zellen als Grundlage für die Differenzierung zu NS verwendet. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Abkömmlinge exponierter hESC in der Lage sind, funktionale, neuronale Netzwerke auszubilden.

Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Um zu untersuchen, ob die NS, die aus bestrahlten hESC hergestellt wurden, ihre spontane Signalgenerierung über denselben Zeitraum aufrecht erhalten können, wie die entsprechenden Kontrollkulturen, wurden ihre Signale bis zum zehnten Tag der elektrischen Aktivität analysiert. In Abbildung 4.22 ist die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen in Prozent bis zum zehnten Tag der elektrischen Aktivität dargestellt. Bis Tag 7 wurden sowohl bei allen Kontrollen, als auch bei allen bestrahlten NS neuronale Signale detektiert. An Tag 8 sinkt der prozentuale Anteil elektrisch aktiver Kulturen in den bestrahlten Kulturen auf 91,6 % und in den Kontrollen auf 90 %. An Tag 10 waren noch 75 % der exponierten Kulturen und 85 % der unbestrahlten Proben elektrisch aktiv.

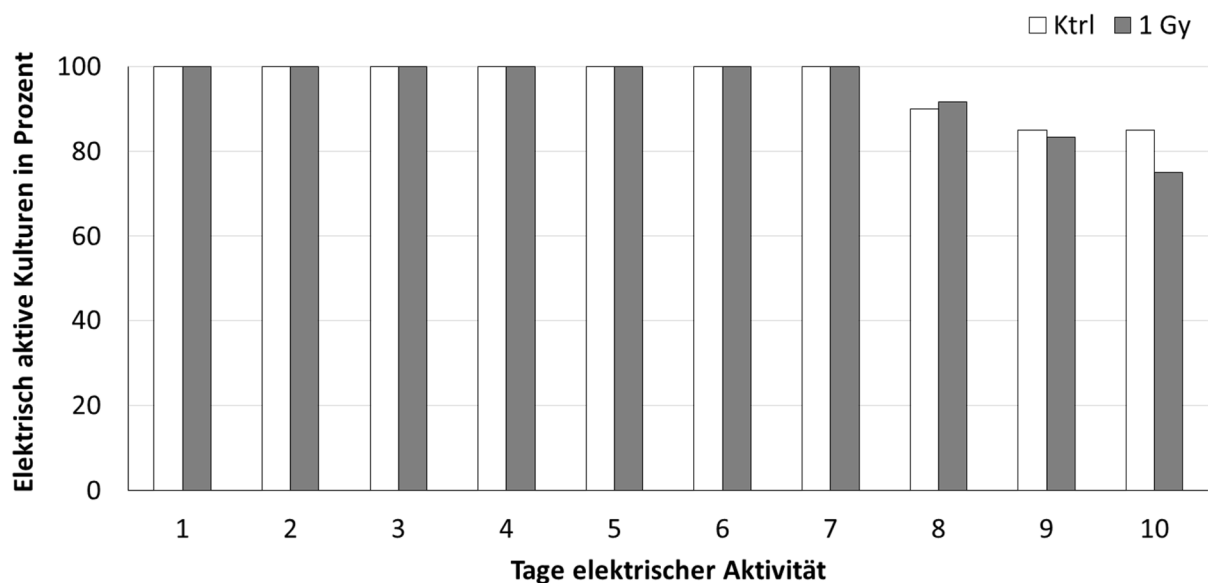


Abbildung 4.22: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf den Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität von Neurosphären. Die Anzahl elektrophysiologisch aktiver Kulturen ist prozentual gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen. In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 1 Gy Röntgenstrahlen (grau) exponierten hESC hergestellt wurden. Am achten Tag der elektrischen Aktivität beginnen die ersten Kulturen ihre spontane Signalgenerierung einzustellen. Am Versuchsende an Tag 10 wurden noch bei 85 % der Kontrollen und bei 75 % der exponierten Kulturen Spikes detektiert. Ein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen wurde nicht nachgewiesen. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus vier voneinander unabhängigen Experimenten (Kontrolle: n = 21, 1 Gy: n = 12).

Anzahl aktiver Elektroden

Bei der Aussaat der NS wurde nicht das gesamte Elektrodenfeld bedeckt, sondern nur diejenigen Elektroden, auf denen die NS platziert wurden. Im Laufe der Kultivierung begannen Zellen und Neurite aus der Sphäre auszuwachsen und weitere Elektroden zu bedecken, so dass diese ebenfalls elektrische Signale detektierten. Anhand der Anzahl der aktiven Elektroden kann demnach untersucht werden, ob eine Exposition mit Röntgenstrahlung das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst. Abbildung 4.23 zeigt die Ergebnisse der Messungen, die bis zum zehnten Tag durchgeführt und auf die Werte an Tag 1 normiert wurden. Die durchschnittliche Anzahl aktiver Elektroden an Tag 1 betrug bei den bestrahlten Kulturen $5,33 \pm 0,9$ und bei den Kontrollen $5,25 \pm 0,6$. Sowohl bei den bestrahlten, als auch bei den unbestrahlten Proben verdoppelte sich dieser Wert im Laufe der ersten Woche und blieb anschließend weitestgehend konstant. Mit Ausnahme des zehnten Tages, an dem die Anzahl der aktiven Elektroden in den bestrahlten Proben signifikant geringer war, als in den Kontrollkulturen (Kontrolle: $2,04 \pm 0,2$, 1 Gy: $1,37 \pm 0,1$ aktive Elektroden), waren zwischen den beiden Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu sehen.

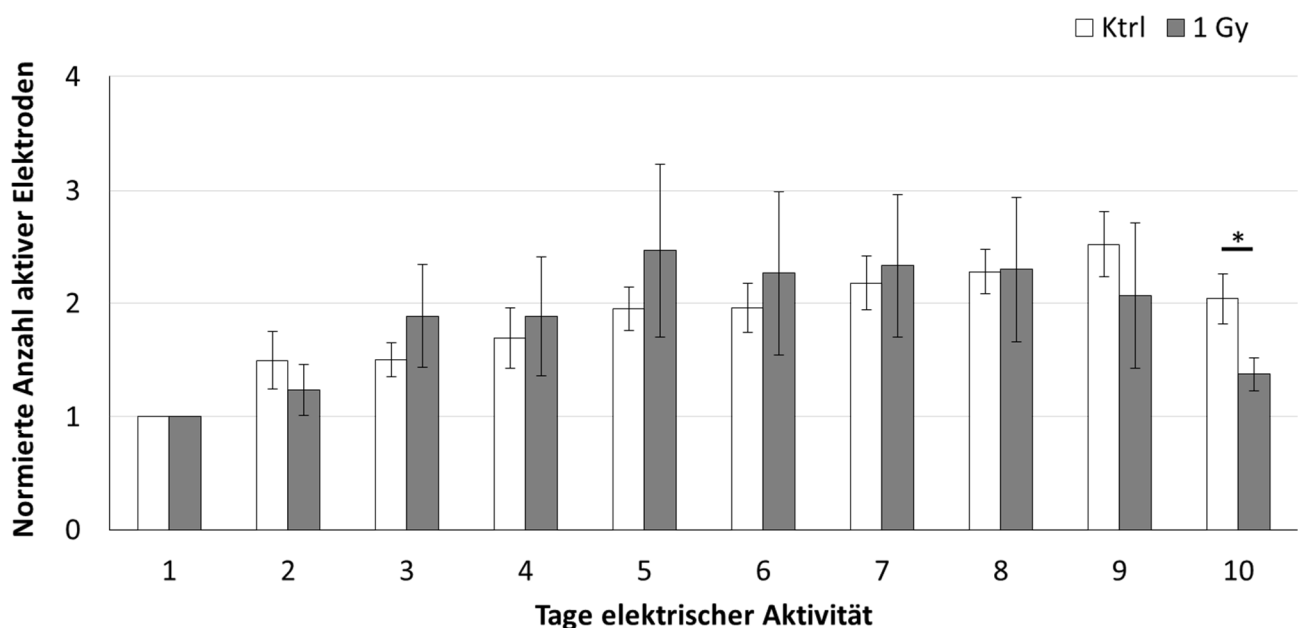


Abbildung 4.23: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl der aktiven Elektroden. Die auf Tag 1 normierte Anzahl aktiver Elektroden ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl aktiver Elektroden an Tag 1: Ktrl: $5,25 \pm 0,6$, 1 Gy: $5,33 \pm 0,9$). In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 1 Gy Röntgenstrahlen (grau) exponierten hESC hergestellt wurden. Die Anzahl der aktiven Elektroden verdoppelte sich im Laufe der ersten Woche bei beiden Versuchsgruppen und blieb anschließend, mit Ausnahme von Tag 10, weitestgehend konstant. An Tag 10 war die Anzahl aktiver Elektroden in den bestrahlten Proben, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant reduziert. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus vier voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 21$, 1 Gy: $n = 12$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft (CI = 95 %, * $p < 0,05$).

Anzahl neuronaler Signale

Bei Betrachtung der Anzahl spontan generierter Spikes zeigte sich, ab dem fünften Tag elektrischer Aktivität, eine verringerte Signalgenerierung bei den NS, die aus bestrahlten hESC hergestellt wurden (Abbildung 4.24). Am ersten Tag der elektrischen Aktivität wurden bei den Kontrollkulturen im Durchschnitt $565 \pm 128,1$ und bei den bestrahlten NS $478,75 \pm 124,1$ Spikes pro Minute detektiert. In beiden Versuchsgruppen verdoppelte sich dieser Wert bis zum vierten Tag. Während die Anzahl der Spikes in den Kontrollen an den darauffolgenden Tagen weiter anstieg und an Tag 8 einen fünffach erhöhten Wert aufwies, verblieb der Wert bei den bestrahlten NS, bis zum Versuchsende an Tag zehn, konstant auf diesem Niveau.

Die Spikeamplituden waren bei beiden Versuchsgruppen vergleichbar und betrugen am ersten Tag elektrischer Aktivität bei den Kontrollen im Durchschnitt $20,27 \pm 1,1 \mu\text{V}$ und bei den bestrahlten NS $18,67 \pm 1,1 \mu\text{V}$. Dieser Wert blieb über die Kultivierungszeit bei beiden Gruppen konstant.

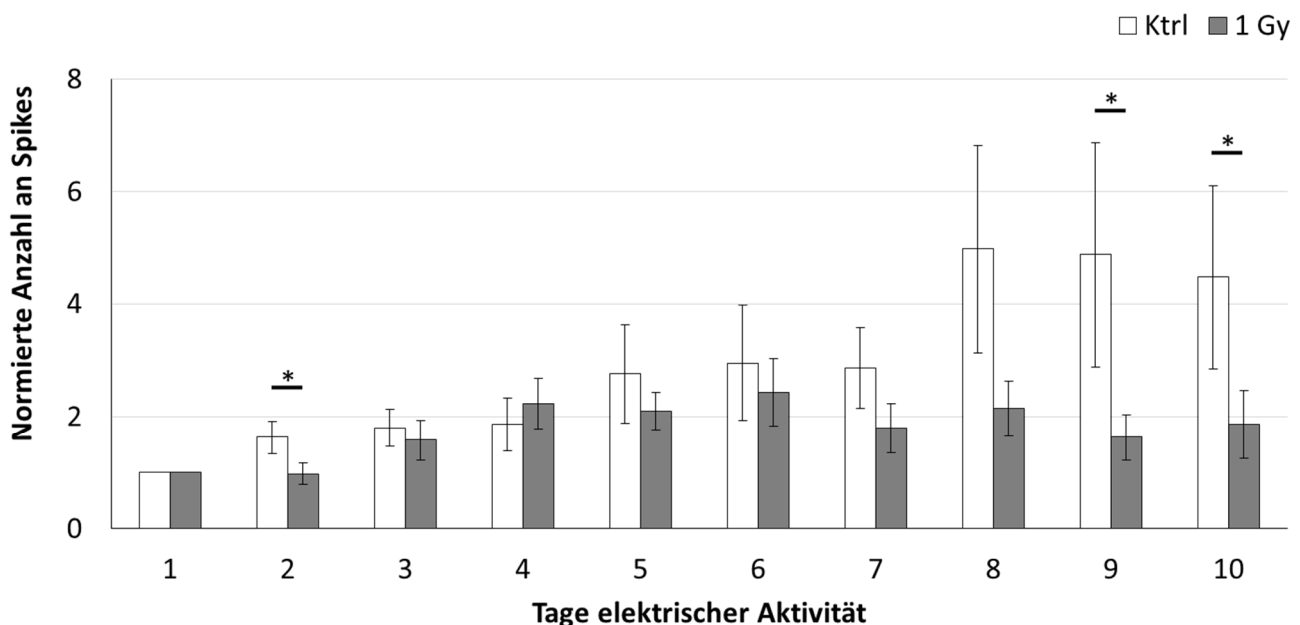


Abbildung 4.24: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl an Spikes. Die auf Tag 1 normierte Summe aller von einer NS detektierten Spikes pro Minute ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl Spikes pro Minute an Tag 1: Ktrl: $565 \pm 128,1$, 1 Gy: $478,75 \pm 124,1$). In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 1 Gy Röntgenstrahlen (grau) exponierten hESC hergestellt wurden. Die Anzahl der Spikes verdoppelte sich im Laufe der ersten vier Tage bei beiden Versuchsgruppen. Während dieser Wert bei den Kontrollen weiter anstieg, verblieb er bei den bestrahlten NS auf dem gleichen Niveau. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus vier voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 21$, 1 Gy: $n = 12$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft (CI = 95 %, * $p < 0,05$).

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Betrachtung der vom Netzwerk generierten Bursts (Abbildung 4.25). Am ersten Tag der elektrischen Aktivität wurden bei den Kontrollen durchschnittlich $45,69 \pm 16,7$ und bei den bestrahlten NS $36 \pm 16,3$ Bursts pro Minute detektiert. Ebenso wie die Anzahl der Spikes,

erhöhte sich auch dieser Wert in beiden Versuchsgruppen bis zum vierten Tag zunächst gleichmäßig auf ein 3-4-faches des Anfangswertes. An den nachfolgenden Tagen stieg die Anzahl der Bursts in den Kontrollen auf das Zwanzigfache an und blieb anschließend weitestgehend konstant. In den bestrahlten Kulturen wurde ebenfalls ein Anstieg in der Burstrate verzeichnet. Der höchste Wert wurde an Tag 8 festgestellt, an dem sich die Anzahl der Bursts um das Zwölfwache des Anfangswertes erhöhte. Der Anstieg der Burstrate fiel in den bestrahlten Kulturen jedoch deutlich geringer aus. Insbesondere an Tag 9 und 10 wurde in den bestrahlten Proben eine signifikant geringere Anzahl an Bursts detektiert, als in den Kontrollgruppen.

Bei der Betrachtung weiterer Burstcharakteristika wurde kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen beobachtet. Am ersten Tag der elektrischen Aktivität bestanden die Bursts in den Kontrollen aus $4,41 \pm 0,3$ Spikes und dauerten durchschnittlich $160 \pm 0,1$ ms. Die Bursts der bestrahlten NS wiesen vergleichbare Werte von $4,25 \pm 0,3$ Spikes pro Burst und eine Dauer von $140 \pm 0,1$ ms auf. Diese Werte blieben in beiden Versuchsgruppen im Laufe der Kultivierung weitestgehend konstant.

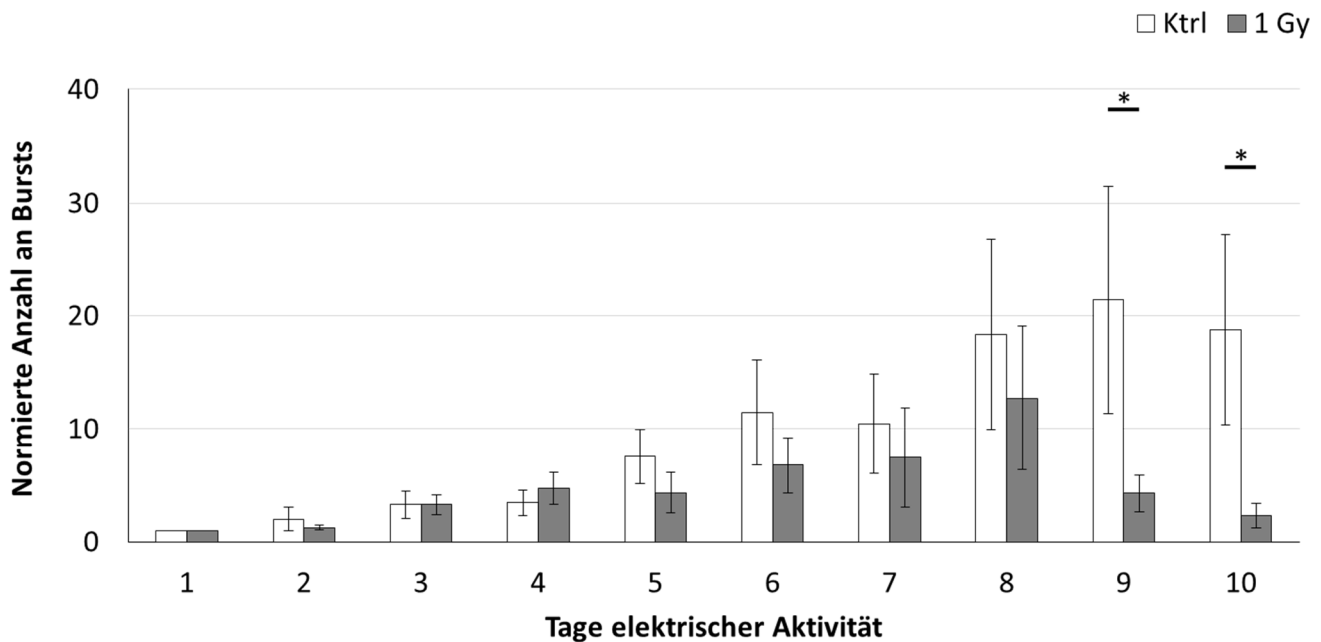


Abbildung 4.25: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Anzahl an Bursts. Die auf Tag 1 normierte Summe aller von einer NS detektierten Bursts pro Minute ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl Bursts pro Minute an Tag 1: Ktrl: $45,69 \pm 16,7$, 1 Gy: $36 \pm 16,3$). In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 1 Gy Röntgenstrahlen (grau) exponierten hESC hergestellt wurden. Die Anzahl der Bursts erhöhte sich in beiden Versuchsgruppen im Laufe der Kultivierungszeit. Ab dem vierten Tag lag die Burstrate der bestrahlten NS jedoch kontinuierlich unter dem Niveau der Kontrollen. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis aus vier voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 21$, 1 Gy: $n = 12$). Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test überprüft (CI = 95 %, * $p < 0,05$).

Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters

Die Betrachtung des Aktivitätsmusters in Form eines Rasterplots verdeutlicht die reduzierte Signalgenerierung in den NS, die auf bestrahlten hESC basieren. In Abbildung 4.26 ist die Netzwerkaktivität einer NS aus der Kontrollgruppe, sowie einer NS, die aus mit 1 Gy Röntgenstrahlung exponierten hESC hergestellt wurde, dargestellt. Am ersten Tag der elektrischen Aktivität war das Aktivitätsmuster in den Versuchsgruppen vergleichbar. In beiden Kulturen wurde bis zu Tag 5 sowohl ein Anstieg in der Anzahl der Spikes, als auch in der Anzahl der Bursts beobachtet. Die Betrachtung der Netzwerkaktivität an Tag 10 verdeutlicht, dass die NS aus bestrahlten hESC, verglichen mit den NS aus der Kontrollgruppe, eine reduzierte Anzahl neuronaler Signale generieren.

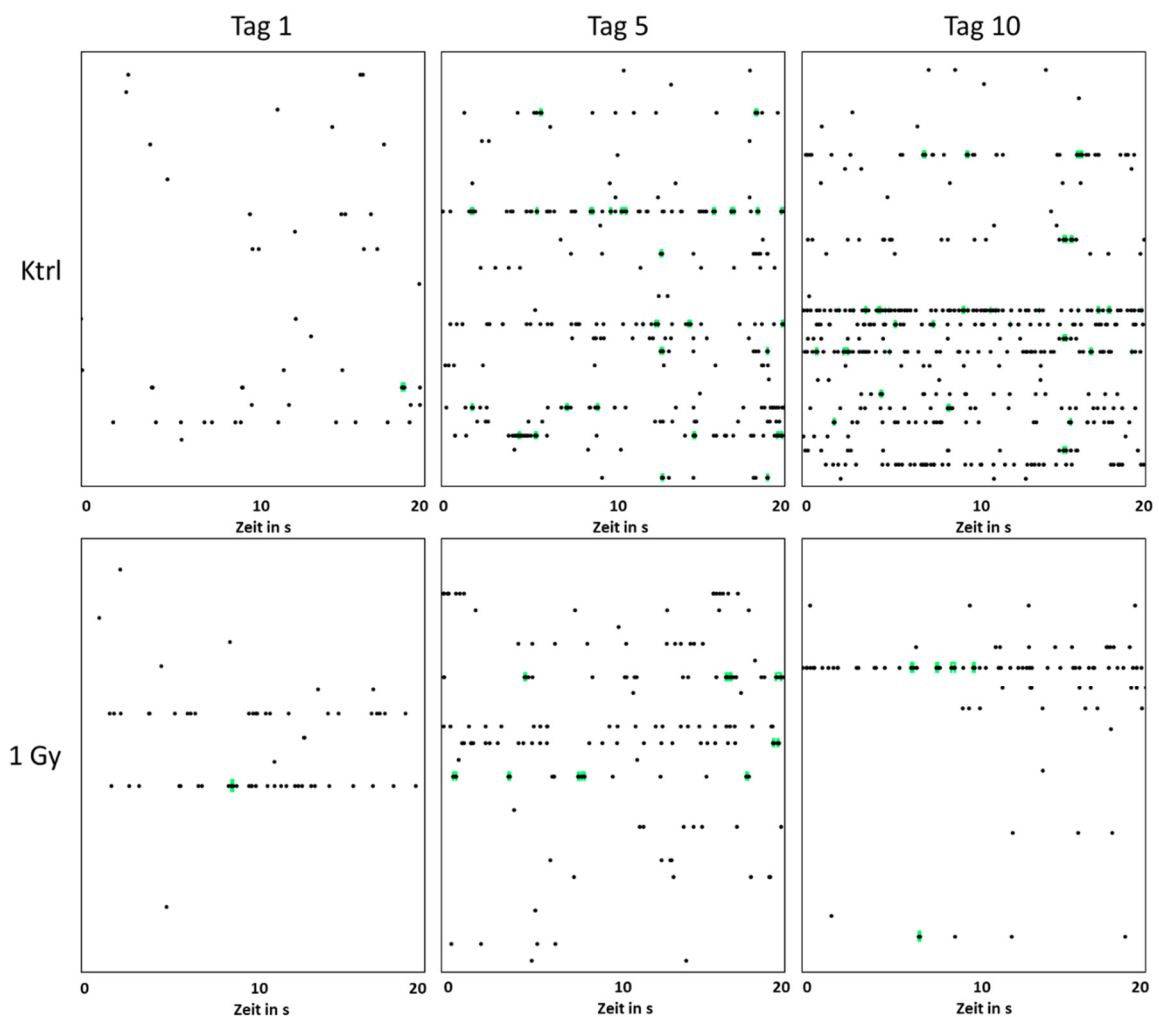


Abbildung 4.26: Einfluss einer Exposition mit Röntgenstrahlung auf die Entwicklung der Netzwerkaktivität. Die Aufzeichnung der elektrischen Aktivität der NS, die aus unbestrahlten oder mit 1 Gy Röntgenstrahlung exponierten hESC hergestellt wurden, erfolgte an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 und ist hier in Form eines Rasterplots dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder einzelne Strich einen Spike und jeder dickere, grün markierte Balken einen Burst. Dargestellt ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Da die Entwicklung der individuellen Kulturen vergleichbar war, ist hier nur eine Messung exemplarisch dargestellt. Bis zu Tag 5 weisen beide Versuchsgruppen ein vergleichbares Aktivitätsmuster auf. An den nachfolgenden Tagen nimmt die Anzahl der Spikes in der Kontrollprobe bis Tag 10 weiter zu, während das Aktivitätslevel in den bestrahlten Kulturen auf das Niveau des ersten Tages zurück fällt.

4.4.2. Größe der Neurosphären

Die Größenbestimmung der NS, die für die elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet wurden, erfolgte am ersten Tag nach der Aussaat auf die MEA Chips. Dadurch wurde überprüft, ob die geringere elektrische Aktivität der NS, die als hESC bestrahlt wurden, auf eine verringerte Größe zurückzuführen ist. Kleinere NS würden weniger Elektroden bedecken, so dass die Anzahl der detektierten Spikes pro Chip geringer wäre.

Wie in Kapitel in 3.3.3 beschrieben, erfolgte die Größenbestimmung durch die manuelle Markierung der NS (Abbildung 4.27A), so dass die darin enthaltene Fläche ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27B dargestellt. Die NS, die aus mit 1 Gy Röntgenstrahlung exponierten hESC hergestellt wurden, besaßen einen Tag nach der Aussaat auf die MEA Chips eine Fläche von $0,68 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$. Die Kontrollkulturen wiesen eine vergleichbare Fläche von $0,66 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ auf. Eine verringerte Größe der bestrahlten NS wurde nicht festgestellt.

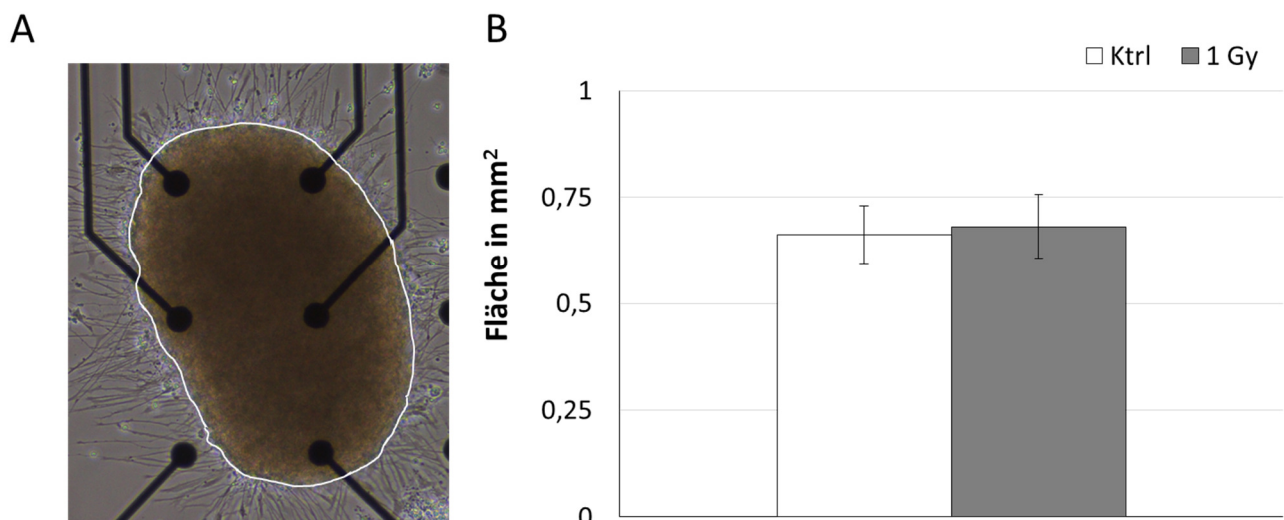


Abbildung 4.27: Größenbestimmung der Neurosphären. Die Größenbestimmung erfolgte am ersten Tag nach der Aussaat. Die Fläche der bereits auf dem Substrat angewachsenen NS wurde mithilfe der Software *ImageJ* bestimmt. Hierfür wurden sie manuell markiert und die Fläche in mm^2 ermittelt (A). Ein Größenunterschied zwischen den Kontrollkulturen (weiß) und den NS, die auf bestrahlten hESC (1 Gy Röntgenstrahlung) basieren (grau), wurde nicht nachgewiesen (B). Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis von drei voneinander unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Ktrl: $n = 17$, 1 Gy: $n = 10$).

4.5. Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurosphären, die auf mit Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC basieren

Im Rahmen dieses Projektes wurden in einem ersten Versuch hESC mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlt und nachfolgend für die Generierung von NS verwendet. Die Bestrahlung erfolgte am HIT mit Strahlendosen von 0,25 Gy oder 0,5 Gy. Nach der Bestrahlung wurden die hESC in einem Reise-Inkubator zurück zur GSI transportiert, an der die weiteren Schritte des Experimentes stattfanden.

Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Aus den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten hESC wurden erfolgreich NS hergestellt. Abbildung 4.28 zeigt die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen in Prozent bis zum Versuchsende an Tag 10. Der Zeitraum der elektrischen Aktivität wurde durch die Bestrahlung nicht beeinflusst. Eine mit 0,25 Gy bestrahlte Kultur stellte an Tag 10 ihre spontane Signalgenerierung ein. Ansonsten reduzierte sich in keiner Versuchsgruppe die Anzahl elektrisch aktiver Kulturen vor dem Versuchsende.

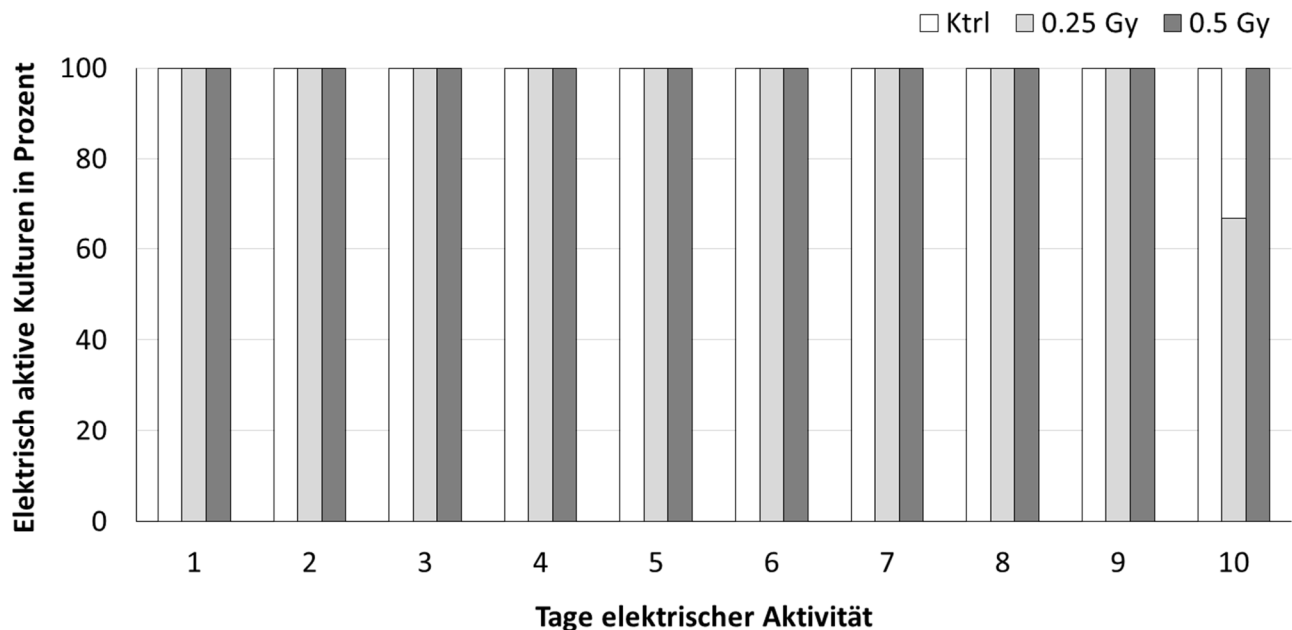


Abbildung 4.28: Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf den Zeitraum elektrischer Aktivität von Neurosphären. Die Anzahl elektrophysiologisch aktiver Kulturen ist prozentual gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen. Die verwendeten Strahlendosen betragen 0,25 Gy und 0,5 Gy. In keiner der Versuchsgruppen kommt es zu einer Reduktion der Anzahl elektrisch aktiver Kulturen bis Tag 9. An Tag 10 stellt eine der mit 0,25 Gy bestrahlten Kulturen die spontane Signalgenerierung ein. Eine Auswirkung der Bestrahlung auf den Zeitraum der elektrischen Aktivität wurde nicht beobachtet. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes (Ktrl: n = 2, 0,25 Gy: n = 3, 0,5 Gy: n = 1).

Anzahl aktiver Elektroden

Bei Betrachtung der Anzahl aktiver Elektroden wurde kein strahleninduzierter Effekt nachgewiesen (Abbildung 4.29). Am ersten Tag der elektrischen Aktivität betrug die Anzahl aktiver Elektroden bei der Kontrollgruppe im Durchschnitt $6 \pm 2,8$, bei den mit 0,25 Gy bestrahlten Kulturen $3,33 \pm 1,9$ und bei der mit 0,5 Gy bestrahlten Kultur 5. In allen Versuchsgruppen verdoppelte sich die Anzahl der aktiven Elektroden bis zum sechsten Tag der elektrischen Aktivität. An den darauffolgenden Tagen sind deutliche Schwankungen zu erkennen. Verglichen mit den Kontrollen, reduzierte sich jedoch die Anzahl aktiver Elektroden in den bestrahlten Kulturen.

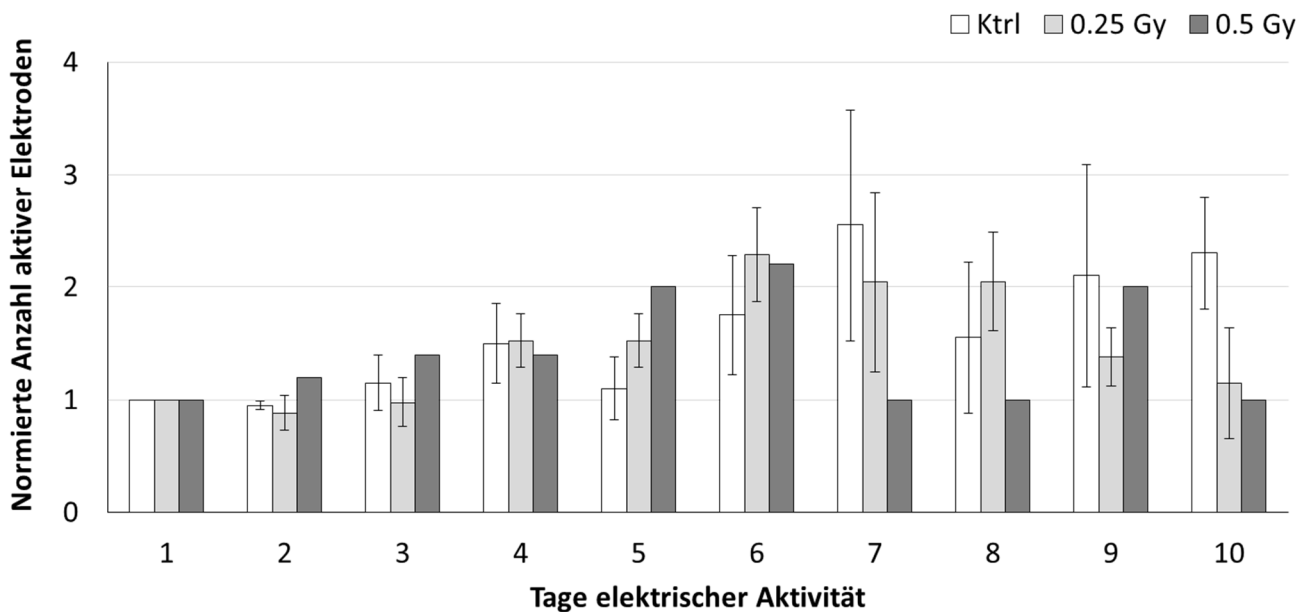


Abbildung 4.29: Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl der aktiven Elektroden. Die auf Tag 1 normierte Anzahl aktiver Elektroden ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl aktiver Elektroden an Tag 1: Ktrl: $6 \pm 2,8$, 0,25 Gy: $3,33 \pm 1,9$, 0,5 Gy: 5). In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 0,25 Gy (hellgrau) oder 0,5 Gy (dunkelgrau) Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden. Im Laufe der ersten sechs Tage verdoppelt sich die Anzahl aktiver Elektroden in allen Versuchsgruppen. An den nachfolgenden Tagen differieren die Werte der unterschiedlich behandelten Kulturen. Verglichen mit der Kontrollgruppe, reduziert sich die Anzahl aktiver Elektroden in den bestrahlten Kulturen. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Ktrl: $n = 2$, 0,25 Gy: $n = 3$, 0,5 Gy: $n = 1$).

Anzahl neuronaler Signale

Die Summe der spontan generierten Spikes, die von bestrahlten und unbestrahlten Kulturen detektiert wurden, ist in Abbildung 4.30 dargestellt. Am ersten Tag der elektrischen Aktivität betrug die Summe der Spikes pro Minute in der Kontrollgruppe $299 \pm 144,3$, bei der mit 0,25 Gy bestrahlten Versuchsgruppe $356 \pm 214,5$ und bei der mit 0,5 Gy exponierten Kultur 325. Bis zum sechsten Tag erhöhte sich die Anzahl der Spikes in allen Kulturen. Dabei wurde in den Kontrollkulturen ein Anstieg der Spikeanzahl um den Faktor $1,5 \pm 0,3$, in den mit 0,25 Gy bestrahlten Proben um den Faktor $0,74 \pm 0,5$ und in der mit 0,5 Gy exponierten Kultur um den Faktor 2,77 nachgewiesen. Der Entwicklungsverlauf war dabei in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar. Ab dem siebten Tag wurden große Differenzen zwischen den Kontrollproben und den bestrahlten Kulturen beobachtet. Die Anzahl der Spikes in den Kontrollproben stieg weiter an, betrug an Tag 7 einen Wert von 3,2 und blieb an den nachfolgenden Tagen konstant. Im Gegensatz dazu sinkt die Anzahl der Spikes in den bestrahlten Kulturen an Tag 7 auf das Niveau des ersten Tages ab. An Tag 10 reduzierte sich die Spikeanzahl in den mit 0,25 Gy bestrahlten Proben auf einen Wert von $0,25 \pm 0,1$ und in der mit 0,5 Gy exponierten Kultur auf einen Wert von 0,57.

Die Spikeamplituden waren in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar. An Tag 1 betrugen die Amplituden der Kontrollgruppe durchschnittlich $22,56 \mu\text{V} \pm 4,0 \mu\text{V}$, bei den mit $0,25 \text{ Gy}$ bestrahlten Proben $18,13 \mu\text{V} \pm 0,4 \mu\text{V}$ und bei der mit $0,5 \text{ Gy}$ exponierten Kultur $16,2 \mu\text{V}$. Diese Werte blieben im Laufe der Kultivierung weitestgehend konstant.

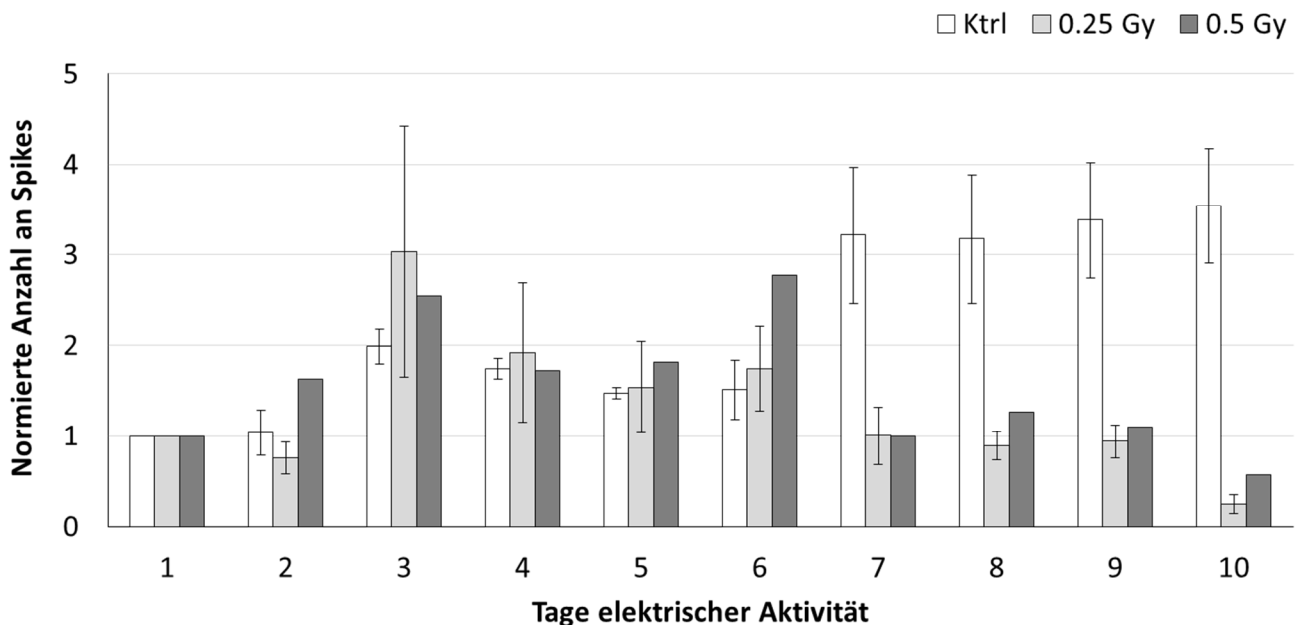


Abbildung 4.30: Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl spontan generierter Spikes. Die auf Tag 1 normierte Summe aller von einer NS detektierten Spikes pro Minute ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl Spikes pro Minute an Tag 1: Ktrl: $299 \pm 144,3$, $0,25 \text{ Gy}$: $356 \pm 214,5$, $0,5 \text{ Gy}$: 325). In diesem Balkendiagramm werden NS miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit $0,25 \text{ Gy}$ (hellgrau) oder $0,5 \text{ Gy}$ (dunkelgrau) Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden. Bis zum sechsten Tag ist der Entwicklungsverlauf in den drei Versuchsgruppen vergleichbar. Während die Spikeanzahl in der Kontrollgruppe ab Tag 7 weiter ansteigt, nimmt sie in den beiden bestrahlten Gruppen ab. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Ktrl: $n = 2$, $0,25 \text{ Gy}$: $n = 3$, $0,5 \text{ Gy}$: $n = 1$).

Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei Betrachtung der Burstanzahl (Abbildung 4.31). Am ersten Tag der elektrischen Aktivität betrug die Summe der Bursts pro Minute in der Kontrolle 9, in den mit $0,25 \text{ Gy}$ bestrahlten Proben $14,5 \pm 9,6$ und in der mit $0,5 \text{ Gy}$ exponierten Probe 17. Bei der Betrachtung dieses Parameters wurde nur 1 Kontrollkultur, 3 mit $0,25 \text{ Gy}$ und 1 mit $0,5 \text{ Gy}$ exponierte Probe berücksichtigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Bursts starken tagesabhängigen Schwankungen unterworfen ist. Während die Burstanzahl in der Kontrollkultur ansteigt und an Tag 8 einen Wert von $12,33$ erreicht, ist in den bestrahlten Kulturen keine kontinuierliche Entwicklung zu erkennen. In den mit $0,25 \text{ Gy}$ exponierten Kulturen erhöhte sich dieser Wert an Tag 3 auf $8,59 \pm 5,2$ und reduzierte sich an Tag 5 wieder auf einen Wert von $1,39 \pm 0,4$. An den nachfolgenden Tagen wurde dieses Niveau beibehalten. Ein ähnlicher Entwicklungsverlauf wurde auch in der mit $0,5 \text{ Gy}$ exponierten Kultur beobachtet. Die Anzahl der Bursts war jedoch zu jedem Zeitpunkt geringer als in der Kontrollprobe.

Die Anzahl der Spikes pro Burst war in den drei Versuchsgruppen vergleichbar. Am ersten Tag der elektrischen Aktivität betrug diese in den Kontrollgruppen $3,52 \pm 0,2$, in den mit 0,25 Gy exponierten Proben $3,66 \pm 0,1$ und in der mit 0,5 Gy bestrahlten Kultur 3,4. Diese Werte blieben im Laufe der Kultivierungszeit von 10 Tagen konstant.

Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Burstdauer. Es wurden keine strahleninduzierten Veränderungen in den exponierten Kulturen beobachtet. An Tag 1 dauerte ein Burst in den Kontrollgruppen durchschnittlich $0,11 \text{ s} \pm 0,02 \text{ s}$, in den mit 0,25 Gy exponierten Kulturen $0,12 \text{ s} \pm 0,01 \text{ s}$ und in der mit 0,5 Gy bestrahlten Probe $0,21 \text{ s}$.

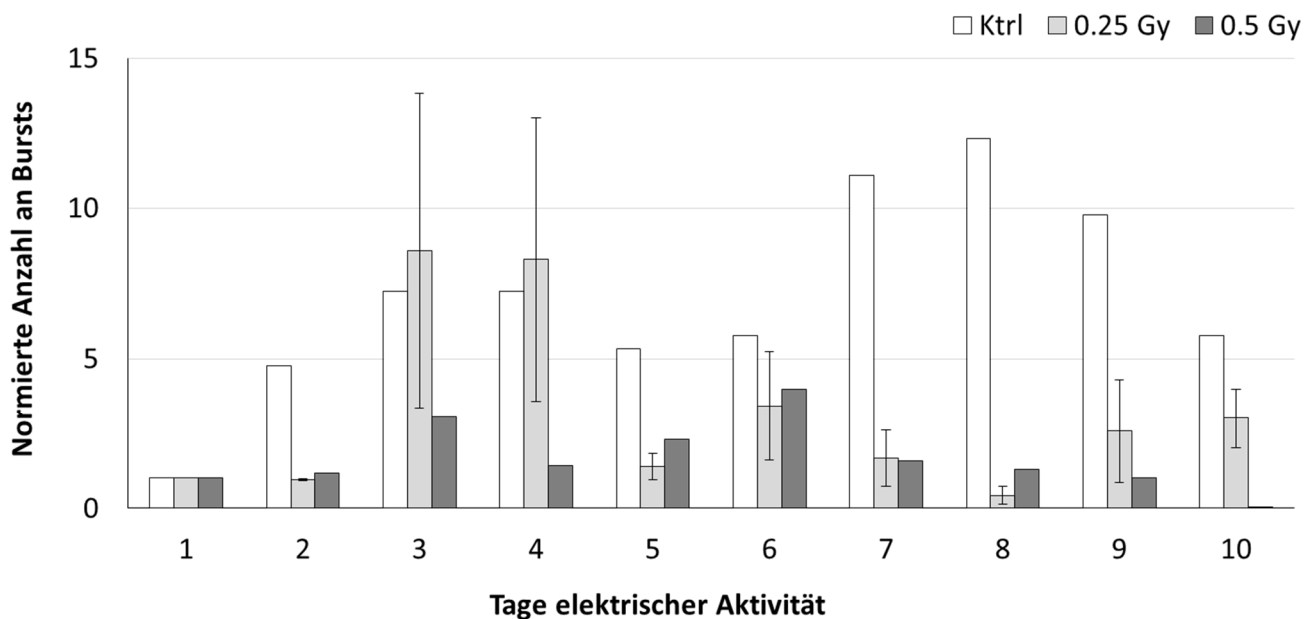


Abbildung 4.31: Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Anzahl spontan generierter Bursts. Die auf Tag 1 normierte Summe aller von einer Neurosphäre detektierten Bursts pro Minute ist gegen die Tage elektrischer Aktivität aufgetragen (Anzahl Bursts pro Minute an Tag 1: Ktrl: 9, 0,25 Gy: $14,5 \pm 9,6$, 0,5 Gy: 17). In diesem Balkendiagramm werden Neurosphären miteinander verglichen, die aus unbestrahlten (weiß) und mit 0,25 Gy (hellgrau) oder 0,5 Gy (dunkelgrau) Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden. Die Anzahl der Bursts in der Kontrollgruppe erhöht sich im Laufe der Entwicklung und erreicht an Tag 8 einen maximalen Wert von 12,33. Die Summe der Bursts, die von den mit 0,25 Gy oder 0,5 Gy bestrahlten Proben generiert wurden, befindet sich deutlich unter dem Niveau der Kontrollkultur. Die hier gezeigten Daten sind das Ergebnis eines Experimentes und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Ktrl: $n = 1$, 0,25 Gy: $n = 3$, 0,5 Gy: $n = 1$).

Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters

Die reduzierte Signalgenerierung der NS, die aus mit Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden, wird bei Betrachtung des Aktivitätsmusters im Rasterplot besonders offensichtlich. In Abbildung 4.32 wird die Netzwerkaktivität einer NS aus der Kontrollgruppe mit einer, die aus mit 0,25 Gy Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurde, verglichen. An Tag 1 ist das elektrische Aktivitätsmuster der beiden NS vergleichbar. Im Laufe der nächsten vier Kultivierungstage wurde bei beiden Kulturen ein Anstieg der Spikes nachgewiesen. Hierbei fällt jedoch auf, dass in der bestrahlten

Probe überwiegend die Anzahl der Spikes zugenommen hat. Die Anzahl der Bursts, die in der Rasterplot Darstellung durch grüne Linien gekennzeichnet sind, hat sich im Vergleich zu Tag 1 nur geringfügig erhöht. An Tag 10 wird die reduzierte elektrische Aktivität in den bestrahlten NS deutlich. Während sich zu diesem Zeitpunkt in der Kontrollprobe ein Aktivitätsmuster entwickelt hat, das aus einer Vielzahl an Spikes und Bursts besteht, ist die Aktivität in der mit 0,25 Gy bestrahlten Kultur auf das Niveau des ersten Tages zurück gefallen. Bei Betrachtung der Kultur, die mit 0,5 Gy bestrahlt wurde, ergibt sich ein vergleichbares Bild.

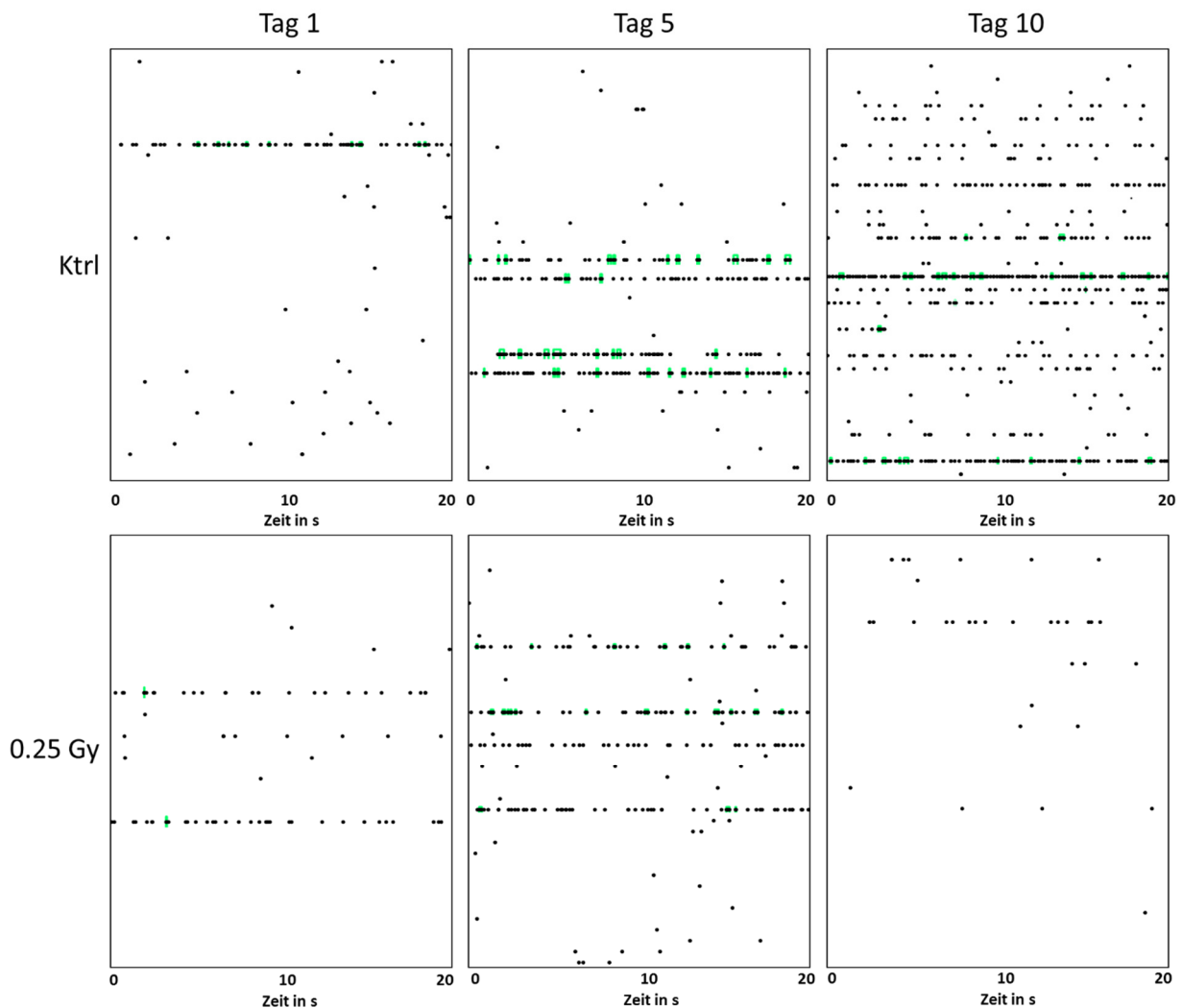


Abbildung 4.32: Einfluss einer Exposition mit Kohlenstoff-Ionen auf die Entwicklung des Aktivitätsmusters von Neurosphären. Die elektrische Aktivität zweier NS, die auf unbestrahlten oder mit 0,25 Gy Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC basieren, wurde an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 nach Detektion der ersten elektrischen Signale aufgezeichnet und ist hier in Form eines Rasterplots dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder einzelne Strich einen Spike und jeder dickere, grün markierte Balken einen Burst. Dargestellt ist die Abfolge der Spikes aller aktiven Elektroden über einen Zeitraum von 20 s. Da die Entwicklung der individuellen Kulturen vergleichbar war, ist hier nur eine Messung exemplarisch dargestellt. An Tag 1 stellt sich bei beiden Proben ein vergleichbares Aktivitätsmuster ein. An Tag 5 hat sich die Anzahl der elektrischen Signale in beiden Kulturen erhöht, wobei die Zunahme der Bursts in der bestrahlten Probe geringer ist, als in der Kontrolle. Während die neuronale Aktivität in der Kontrollprobe bis Tag 10 weiter zunimmt, fällt das Aktivitätslevel in der bestrahlten Kultur auf das Niveau des ersten Tages zurück.

5. Diskussion

Der sich entwickelnde Embryo ist gegenüber einer Exposition mit ionisierender Strahlung besonders empfindlich. Epidemiologische Studien an schwangeren Frauen haben gezeigt, dass eine *in utero* Exposition zu schwerwiegenden neurologischen Defekten des Kindes führen kann [3, 101]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, wurden bei tierexperimentellen Studien kognitive Dysfunktionen infolge einer Bestrahlung festgestellt, die sich beispielsweise in einem beeinträchtigten Erinnerungsvermögen oder einem verringerten räumlichen Lernvermögen manifestierten [102-105]. So untersuchten Brown et al. [104] beispielsweise das räumliche Lernverhalten 4 Monate alter Ratten in einem sternförmigen Labyrinth-Test, 6 und 9 Monate nach der Exposition des Gehirns mit 40 Gy γ -Strahlung (fraktioniert, 2x wöchentlich jeweils 5 Gy über einen Zeitraum von 4 Wochen). Bei diesem Test wurde in bestimmten Armen des Labyrinths Nahrung versteckt, die es schnell zu finden galt. Dabei zeigte sich, dass exponierte Tiere schlechter abschnitten, als diejenigen aus der Kontrollgruppe.

Dennoch kann eine *in utero* Exposition nicht immer vermieden werden, wie beispielsweise durch eine medizinische Strahlenanwendung in den ersten Tagen nach der Konzeption, wenn die Schwangerschaft noch nicht bekannt ist oder auf Grund eines Strahlenunfalls. Aufgrund dessen ist es von enormer Wichtigkeit, die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf das sich entwickelnde Nervensystem genauer zu untersuchen, um dadurch eine bessere Risikoabschätzung durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke mithilfe der MEA Technologie untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Zellsysteme verwendet. Als zweidimensionales Zellmodell kamen kortikale Neurone aus 18 Tage alten, embryonalen Ratten zum Einsatz. Obwohl der Einsatz von Tiermodellen einen hohen Beitrag zu unserem derzeitigen Wissensstand geleistet hat, sind die dadurch gewonnenen Erkenntnisse nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar. So wurde in diversen Studien die Toxizität spezieller Substanzen für den Menschen nachgewiesen, die in vorausgegangenen tierexperimentellen Untersuchungen keine negativen Auswirkungen hatten [106, 107]. Aufgrund dessen wurde in enger Zusammenarbeit mit der GSI ein dreidimensionales neuronales Modellsystem etabliert, das auf hESC basiert. Diese Zellen werden in der Forschung als Modellsystem verwendet um die frühe humane Entwicklung zu untersuchen. Da sie aus der inneren Zellmasse eines etwa fünf Tage alten Embryos isoliert wurden, imitieren sie das Blastocysten Stadium und können frühe humane Entwicklungsprozesse rekapitulieren [108, 109]. In den hier durchgeführten Experimenten wurden hESC mit ionisierender Strahlung exponiert, zu einer adhärennten Kultur NSC differenziert und anschließend in einer Suspensionskultur in dreidimensionalen NS zu Neuronen weiter entwickelt. Anschließend wurde untersucht, ob die Exposition der hESC mit ionisierender Strahlung einen Einfluss auf die elektrische Aktivität der Neurone hat, die sich aus diesen Zellen entwickeln.

In den Kapiteln 5.1 und 5.2 werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen Charakterisierung der kortikalen Rattenneurone, sowie ihre Reaktion auf die Exposition mit Röntgenstrahlung behandelt. Kapitel 5.3 beschäftigt sich mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Charakterisierung der aus hESC differenzierten NS. Das elektrische Aktivitätsmuster der NS, die aus mit Röntgen- oder Kohlenstoff-Ionenstrahlung exponierten hESC hergestellt wurden, wird in Kapitel 5.4 näher erläutert.

5.1. Kortikale Rattenneurone bilden ein funktionales Netzwerk auf den MEA Chips aus

Bei den primären, kortikalen Neuronen aus der Ratte handelt es sich um ein stabiles und gut etabliertes *in vitro* Modellsystem. Es stellt ein vereinfachtes und gut zugängliches Modell des zentralen Nervensystems dar, das in Hinblick auf die Zellmorphologie der *in vivo* Situation ähnelt [110, 111].

Insbesondere bei elektrophysiologischen Untersuchungen mithilfe der MEA Technologie werden sie in vielen Bereichen eingesetzt, um diverse Prozesse, wie beispielsweise die neuronale Netzwerkaktivität [112, 113] und die synaptische Plastizität [114, 115], zu untersuchen. Des Weiteren kommen sie bei pharmakologischen Untersuchungen [116, 117] zum Einsatz.

Dieses Modellsystem wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss ionisierender Strahlung auf primäre, neuronale Netzwerke zu untersuchen. Zuvor wurde eine umfassende elektrophysiologische Charakterisierung der spontan generierten elektrischen Signale durchgeführt. Die Detektion der ersten neuronalen Signale erfolgte in der Regel an 16 *div*. In anderen Publikationen wird von einem früheren Einsetzen der spontanen Aktivität berichtet [17, 66], die in Ausnahmefällen bereits an 3 *div* nachgewiesen wurde [118, 119]. Mögliche Ursachen für diese Differenzen könnten unterschiedliche Kultivierungsbedingungen oder eine andere Aussaatdichte der Zellen auf den MEA Chips sein.

Bei den an 16 *div* detektierten Signalen handelt es sich hauptsächlich um spontan auftretende, einzelne Spikes. Bursts traten zu diesem Zeitpunkt ebenfalls auf, jedoch nur in einer sehr geringen Anzahl. Sowohl die Anzahl der Spikes, als auch diejenige der Bursts nahm im Laufe der Entwicklung bis 26 *div* zu und blieb an den nachfolgenden Tagen weitestgehend konstant. Dieser Anstieg war erwartungsgemäß, da in anderen Studien ein signifikanter Anstieg der Synapsendichte in der zweiten und dritten Kultivierungswoche beschrieben wurde [111]. Dabei werden sowohl exzitatorische, als auch inhibitorische Synapsen ausgebildet [120]. Während in den hier durchgeführten Experimenten die Anzahl der elektrischen Signale ab 26 *div* weitestgehend konstant blieb, wurde in vergleichbaren Studien ein anderer Entwicklungsverlauf beschrieben. Wagenaar et al. [121] berichteten über eine kontinuierliche Erhöhung der Burstanzahl bis 35 *div*. In Chiappalone et al. [122] hingegen wurde eine maximale Spike- und Burst-Anzahl an 21 *div* beschrieben, die sich an den weiteren Kultivierungstagen wieder verringerte. Der Grund für diese divergenten Entwicklungen der neuronalen Signale könnte ebenfalls eine andere Aussaatdichte der Zellen auf den MEA Chips sein. Mehrere Studien beschäftigten

sich bereits mit dem Einfluss der Zelldichte auf die Entwicklung der Netzwerkaktivität neuronaler Zellen [121, 123, 124]. Dabei zeigte sich, dass diese die Entwicklung eines neuronalen Netzwerkes maßgeblich beeinflusst und Auswirkungen auf diverse elektrophysiologische Parameter, wie beispielsweise die Anzahl der spontan generierten Signale, die Anzahl der aktiven Elektroden, sowie die Länge der Bursts und Netzwerkbursts, hat [123].

Die Dauer der detektierten Bursts in der vorliegenden Arbeit betrug an 16 *div* $0,97 \pm 0,2$ Sekunden. Dieser Wert verringerte sich im Laufe der Kultivierungszeit und betrug an 44 *div* noch $0,55 \pm 0,1$ Sekunden. Diese Beobachtung stimmt mit denjenigen anderen Studien überein [121, 122]. Die Kulturen kortikaler Rattenneurone entwickelten im Laufe von drei Wochen ein stabiles Aktivitätsmuster, das von synchron auftretenden Bursts dominiert wird. Diese Entwicklung wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben [121, 122].

5.2. Netzwerkaktivität kortikaler Rattenneurone wird durch eine Exposition mit Röntgenstrahlung nicht beeinflusst

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Entwicklung der Netzwerkaktivität primärer, kortikaler Rattenneurone untersucht. Hierbei wurden Strahlendosen von 1 Gy und 2 Gy verwendet. Die Exposition erfolgte an 16 *div*, an dem die ersten elektrischen Signale detektiert wurden. Die darauffolgende Entwicklung der Netzwerkaktivität wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Anzahl der Spikes, als auch die der Bursts zu den Zeitpunkten 1h, 3h und 6h nach Bestrahlung, im Vergleich zur Messung vor der Exposition, erhöht sind (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13). Da diese Erhöhung jedoch auch in den Kontrollkulturen festgestellt wurde, ist sie nicht auf die Bestrahlung zurück zu führen, sondern vielmehr auf den Transport der Zellen zur Röntgenröhre und zurück ins Labor. Eine veränderte Netzwerkaktivität infolge eines Transportes der MEA Chips wurde auch in einer anderen Studie beschrieben. Wagenaar et al. [121] untersuchten die Auswirkungen eines Transportes des MEA Chips vom Inkubator zum Messsystem auf die neuronalen Signale kortikaler Rattenneurone. Dabei wurde insbesondere bei jungen Kulturen (<20 *div*) eine erhöhte Aktivität nachgewiesen. Obwohl dieser Effekt überwiegend in den ersten fünf Minuten nach dem Transport auftrat, wurde bei einigen Kulturen auch noch nach 12 Stunden ein verändertes Aktivitätsmuster nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Röntgenexperimente zeigen, dass die Funktionalität des neuronalen Netzwerkes eine hohe Robustheit gegenüber Röntgenstrahlung aufweist und durch die applizierten Strahlendosen von 1 Gy und 2 Gy nicht beeinflusst wurde. In der untersuchten Zeitspanne wurde keiner der analysierten Parameter infolge der Bestrahlung signifikant modifiziert (Kapitel 4.2.2).

Im Gegensatz dazu berichteten bereits frühere Studien über ein verändertes Aktivitätsmuster infolge einer Exposition mit ionisierender Strahlung. *In vivo* Studien am Hippocampus von Meerschweinchen,

Mäusen und Kaninchen belegten eine reduzierte Signalgenerierung, sowie eine Desynchronisierung der Signale [125, 126]. *In vitro* Untersuchungen an hippocampalen Gehirnschnitten des Meerschweinchens bestätigten diese Ergebnisse [127, 128]. Bei diesen Studien wurden jedoch sehr hohe Strahlendosen von 5-100 Gy eingesetzt. Neuere Veröffentlichungen zeigten, dass bereits durch geringere Strahlendosen eine modifizierte Netzwerkaktivität hervorgerufen wird. An hippocampalen Schnitten, die aus mit 1-4 Gy Eisen-Ionen exponierten Mäusen angefertigt wurden, zeigte sich eine erhöhte dendritische Erregbarkeit, sowie eine inhibierte Plastizität [129]. Durch eine Exposition mit 0,25 Gy und 1 Gy Si-Ionen wurde eine Verringerung der Spike Amplitude, sowie eine Reduktion der neuronalen Aktivität an murinen, hippocampalen Schnitten festgestellt [130]. All diese Untersuchungen wurden jedoch an hippocampalen Gehirnstrukturen durchgeführt. In der subgranulären Zone des Hippocampus befinden sich, auch im adulten Gehirn, neurale Stammzellen, die zeitlebens die Entstehung neuer Neurone gewährleisten und eine zentrale Rolle in Lern- und Erinnerungsprozessen ausüben [131]. Diesen neuronalen Stammzellen der subgranulären Zone wird eine hohe Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, auch in einem Dosisbereich von ≤ 5 Gy, zugeschrieben, die sich in einer erhöhten Apoptoserate, sowie einer Inhibition des Zellzyklus äußert [132].

Dies könnte der Grund dafür sein, dass bei den kortikalen Rattenneuronen keine strahleninduzierten Veränderungen der Netzwerkaktivität beobachtet wurden. Bei den hier verwendeten Zellen handelt es sich um postmitotische Zellen. Dies wurde durch eine Antikörperfärbung gegen das Protein β -III Tubulin nachgewiesen (Abbildung 4.2). Bei β -III Tubulin handelt es sich um ein Protein des Zytoskeletts, das als Marker für neu generierte, postmitotische Neurone angesehen wird [133, 134]. Eine erhöhte Strahlensensibilität wird insbesondere den Zellen zugeordnet, die undifferenziert und besonders proliferativ sind. Dies konnte bereits 1965 von Sinclair et al. [135] nachgewiesen werden. Untersuchungen an synchronisierten Zellkulturen haben hier gezeigt, dass Zellen in der G₂-Phase und M-Phase am empfindlichsten auf Strahlung reagieren und in der späten S-Phase die höchste Strahlenresistenz aufweisen. Durch weitere Studien konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. 1999 untersuchten Peißner et al. [136] die strahleninduzierten Apoptosen im Hippocampus adulter Ratten. Dabei hat sich gezeigt, dass fünf Stunden nach der Bestrahlung eine hohe Anzahl proliferierender, KI - 67 positiver Zellen eine Apoptose einleiten. Des Weiteren untersuchten Borges et al. [137] 2004 die strahleninduzierten Apoptosen an neonatalen Mäuseretinae. Der Nachweis, dass insbesondere die proliferierenden Zellen infolge der Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy absterben, erfolgte über TUNEL, BrdU und PCNA Antikörperfärbungen. Eine Kolokalisation zwischen den apoptotischen (TUNEL positiv) und den proliferierenden Zellen (BrdU bzw. PCNA positiv) konnte 6 und 24 Stunden nach der Bestrahlung nachgewiesen werden.

Die Induktion apoptotischer Ereignisse in postmitotischen, differenzierten Neuronen *in vitro*, infolge einer Exposition mit ionisierender Strahlung, wurde durch den Einsatz höherer Strahlendosen

nachgewiesen. Noel et al. [138] untersuchten 1998 die strahleninduzierten Apoptosen in primären, kortikalen Neuronen aus der Ratte nach Exposition mit steigenden Strahlendosen. Dabei zeigte sich, dass erst Strahlendosen ab 3,5 Gy das Überleben der neuronalen Zellen signifikant reduzierten. Vergleichbare Untersuchungen an kortikalen Neuronen der Ratte [139], sowie an cerebralen Neuronen der Maus bestätigten diese Ergebnisse [140].

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Röntgenstrahlung einen Apoptose-unabhängigen Einfluss auf differenzierte Neurone hat [141]. Hierfür wurden primäre, hippocampale Neurone aus der Ratte mit Röntgenstrahlung exponiert und nachfolgend auf Veränderungen hinsichtlich der Morphologie, der Dichte, sowie des Zytoskeletts der Dornfortsätze untersucht. Dabei zeigte sich eine verringerte Dichte, sowie eine veränderte Morphologie der Dornfortsätze, die durch ein reduziertes Level an Proteinen im Zytoskelett (F-Aktin, Drebrin) bedingt waren [141]. Diese strahleninduzierten Modifikationen könnten einen Einfluss auf die elektrische Netzwerkaktivität haben [142]. Jedoch wurden auch in dieser Studie Strahlendosen von 30 – 90 Gy verwendet.

Um zu überprüfen, ob die kortikalen Rattenneurone auf den MEA-Chips der gewünschten Strahlendosis ausgesetzt waren, wurde zusätzlich zur physikalischen Messung der applizierten Dosis eine Biodosimetrie durchgeführt [143]. Hierfür wurden die strahleninduzierten DNA-DSB manuell ausgezählt und mit bekannten Werten aus der Literatur verglichen. Zur Detektion der DSB wurde eine γ H2AX-Antikörperfärbung durchgeführt. Diese Färbung beruht auf der Detektion des Histons H2AX, das nach der Induktion eines DNA-DSB phosphoryliert und als γ H2AX bezeichnet wird [144]. Diese Phosphorylierung ist einer der frühesten Schritte in der zellulären Antwort auf DNA-DSB und kann bereits einige Minuten nach der Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Anzahl der γ H2AX markierten DNA-DSB steigt dabei proportional zur eingesetzten Strahlendosis [144]. Pro induziertem DNA-DSB wird jedoch nicht nur ein einziges H2AX Histon phosphoryliert, vielmehr akkumulieren hundert bis tausend γ H2AX-Moleküle in direkter Umgebung dieses Bereiches [145]. Durch diese Akkumulation der γ H2AX-Histone, kann ein einziger DSB mithilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden.

Um die Dosimetrie zu überprüfen, wurden kortikale Neurone aus der Ratte auf *Coverslips* kultiviert, an 16 *div* mit einer Strahlendosis von 1 Gy oder 2 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung fixiert. Die strahleninduzierten DNA-DSB wurden anschließend mithilfe einer γ H2AX-Antikörperfärbung detektiert und manuell ausgezählt (Abbildung 4.9). Durch eine Strahlendosis von 1 Gy wurden 30 Minuten nach der Bestrahlung im Durchschnitt $11,22 \pm 2,8$ γ H2AX-DSB pro Zellkern nachgewiesen.

Die Anzahl der γ H2AX markierten DNA-DSB, die durch eine Strahlendosis von 2 Gy induziert wurden, war erwartungsgemäß sehr viel höher. 30 Minuten nach der Bestrahlung waren es im Durchschnitt $19,86 \pm 5,0$ DSB pro Zellkern. Eine Verdopplung der Strahlendosis führte jedoch nicht zu einer doppelt so hohen Anzahl an DNA-DSB, wie es von Rogakou et al. [144] beschrieben wurde. Eine mögliche

Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass das γ H2AX-Signal, insbesondere durch eine Bestrahlung mit 2 Gy, flächig im ganzen Zellkern verteilt war, so dass die Erkennung einzelner Brüche erschwert wurde (vgl. Abbildung 4.9A). Die manuelle Auszählung könnte somit zu Fehlern geführt haben, die die geringe Anzahl an DNA-DSB erklären würde. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte im sogenannten *Clustering* liegen. Dabei handelt es sich um die Fusion mehrerer DNA-DSB zu einem einzigen Bruch, so dass auch nur ein deutliches γ H2AX-Signal zu erkennen ist [146]. 24 Stunden nach der Bestrahlung waren in den bestrahlten Proben nur noch vereinzelt DNA-Doppelstrangbrüche vorhanden (vgl. Abbildung 4.9B). Zusammenfassen kann jedoch gesagt werden, dass die Anzahl der strahleninduzierten DNA-DSB in den kortikalen Rattenneuronen vergleichbar ist mit derjenigen, die in anderen Studien nachgewiesen wurde [147, 148]. Somit bestätigt die hier durchgeführte Biodosimetrie, die physikalische Messung der applizierten Strahlendosis.

5.3. Neurosphären bilden funktionale Netzwerke auf den MEA Chips aus

Gegenwärtig gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Studien, die eine erfolgreiche Kultivierung dreidimensionaler Neuroaggregate auf MEA Chips beschreiben. Diese umfassen 3D-Kulturen hippocampaler Rattenneurone [26], sowie neuraler 3D-Aggregate aus humanen NSC [31] und ESC [29, 30]. In diesen Studien stehen jedoch nicht die funktionale Entwicklung der Netzwerke im Mittelpunkt, sondern die Reaktionen der Zellen auf pharmakologische Substanzen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher die Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters der NS, im Laufe der ersten 10 Tage nach Detektion der initialen Signale, detaillierter analysiert. Die Durchführung von Experimenten über einen längeren Zeitraum war aufgrund von Adhäsionsproblemen der NS auf den MEA Chips noch nicht möglich. Die initialen elektrischen Signale traten im Laufe der ersten Woche nach Aussaat der NS auf den MEA Chips auf. In Kulturen, die in diesem Zeitraum keine Signale generierten, traten auch in den nachfolgenden Wochen keine mehr auf. Diese Gegebenheit stimmt mit Beobachtungen anderer Studien überein [29]. Bei den ersten detektierten Signalen handelte es sich um einzeln auftretende Spikes. Simultan dazu wurden vereinzelt Bursts detektiert. In den nachfolgenden Tagen kam es zu einer deutlichen Zunahme der elektrischen Aktivität, die sich in einer erhöhten Anzahl aktiver Elektroden, sowie einer gesteigerten Spike- und Burstrate manifestierte (vgl. Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18). Weitere Parameter, wie beispielsweise die Höhe der Signalamplitude, sowie die Dauer der Bursts und ihre durchschnittliche Spikeanzahl, blieben im Laufe der Netzwerkentwicklung konstant. Interessanterweise beschrieben Heikkilä et al. [29] das Auftreten von Bursts zu späteren Zeitpunkten der Netzwerkentwicklung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlichen Versuchsprotokollen liegen, die für die elektrophysiologischen Messungen verwendet wurden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden einzelne NS auf das Elektrodenfeld der MEA Chips platziert. Die elektrische Aktivität wurde daher sowohl von den intakten dreidimensionalen NS, als auch

von den auswachsenden Neuronen detektiert. Im Gegensatz dazu wurden die NS bei Heikkila et al. [29] in kleine Aggregate präpariert und 10-15 dieser Aggregate um das Elektrodenfeld der MEA Chips positioniert. Die neuronale Aktivität wurde ausschließlich von denjenigen Zellen abgeleitet, die in Form eines *Monolayers* über das Elektrodenfeld migriert sind. Diese differierende Herangehensweise könnte eine Erklärung für die unterschiedliche funktionale Entwicklung der beiden Kulturmodelle sein. Frega et al. [26] untersuchten 2014 die Entwicklung der elektrischen Aktivität hippocampaler Neurone sowohl in einem zwei-, als auch in einem dreidimensionalen Modell und stellten die Ergebnisse einander gegenüber. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kulturmodellen bezüglich des Auftretens spontan generierter Spikes, der durchschnittlichen Burst-, sowie der durchschnittlichen Netzwerkburstrate.

Ein generelles Merkmal von sich entwickelnden neuronalen Netzwerken *in vitro* ist die Entwicklung eines Aktivitätsmusters, das von synchronen Bursts dominiert wird [20, 149]. Dies konnte bei einer Vielzahl zweidimensionaler Zellmodelle beobachtet werden, wie beispielsweise in kortikalen Neuronen aus der Ratte [17, 26, 66], in neuronalen Kulturen aus dem Huhn [116], in ESC abstammenden Neuronen der Maus [68, 150], sowie in humanen Neuronen, die aus ESC [29, 30] und iPSC [67] differenziert wurden. Synchrone Bursts spielen eine wichtige Rolle in der Etablierung neuronaler Verbindungen *in vivo*. Im Gegensatz zu der Situation *in vitro*, treten diese Ereignisse während der humanen Embryonalentwicklung nicht konstant auf, sondern sind zeitlich limitiert. Frühere Studien konnten zeigen, dass sich eine synchrone Netzwerkaktivität im humanen zerebralen Kortex in der 20. Schwangerschaftswoche entwickelt, bis zur Geburt erhalten bleibt und anschließend wieder abnimmt [151-153]. Das kontinuierliche Auftreten synchroner Bursts *in vitro* könnte in diesem Zusammenhang als ein Stillstand in der Entwicklung angesehen werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, wiesen die NS ein Aktivitätsmuster auf, das eine Vielzahl an Spikes und Bursts beinhaltet, die jedoch nur selten synchron an mehreren Elektroden detektiert wurden (Abbildung 4.19). Diese Tatsache unterstreicht die Eignung dieses Zellmodelles als Plattform, um die Auswirkung diverser Faktoren auf die neuronale Entwicklung zu untersuchen, da sie die elektrophysiologische *in vivo* Situation besser nachbildet. Eine reduzierte Netzwerksynchronität in dreidimensionalen Zellmodellen wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen beobachtet. So analysierten Frega et al. [26] das Aktivitätsmuster hippocampaler Rattenneurone und konnten dabei feststellen, dass dreidimensional kultivierte Zellen eine geringere globale Netzwerksynchronität ausbilden, als die Zellen, die als *Monolayer* kultiviert wurden. Smith et al. [31] kultivierten humane, aus NSC differenzierte Neurone, in einem neutralen, dreidimensionalen Gerüst und konnten an einigen Elektroden simultan auftretende Bursts detektieren. Globale, synchrone Bursts waren jedoch auch in diesem Fall nur selten zu sehen.

Die reduzierte Synchronität in dreidimensionalen, neuronalen Zellkulturmodellen könnte mit dem GABAergen System in Verbindung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Subtypen von

GABAergen Neuronen eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der Synchronität in dem sich entwickelnden Neocortex und Hippocampus besitzen [154-157]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass GABAerge Interneurone, deren Neurite weitläufige Verbindungen besitzen, in der Ausbildung eines asynchronen Netzwerks involviert sind [26, 157]. Daraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass dreidimensionale, neuronale Zellmodelle eine höhere Anzahl an GABAergen Interneuronen besitzen, die weitläufigere Verbindungen zu anderen Zellen eingehen und somit zu einem Verlust der Synchronität beitragen [26].

Die Präsenz von GABAergen Neuronen in den in dieser Arbeit verwendeten NS wurde durch die Applikation des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicucullin bestätigt. Unmittelbar nach der Zugabe wurde eine deutlich erhöhte Netzwerkaktivität beobachtet und das Aktivitätsmuster wurde von regelmäßig auftretenden Bursts dominiert, die synchron an allen Elektroden auftraten (Abbildung 4.21). Diese elektrophysiologische Reaktion ist physiologisch angemessen und vergleichbar mit Beobachtungen aus der Literatur [26, 29, 158]. Eine detaillierte Untersuchung der GABAergen Interneurone, beispielsweise durch spezifische immunhistochemische Färbungen, könnte zu einem besseren Verständnis der reduzierten Synchronität in dreidimensionalen neuronalen Zellmodellen beitragen.

5.4. Auswirkungen einer Exposition mit ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Neurosphären

Eine pränatale Exposition mit ionisierender Strahlung kann zu kognitiven Dysfunktionen und Fehlbildungen des Gehirns führen [3, 4]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine *in utero* Bestrahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des sich entwickelnden Nervensystems hat, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der diese Situation imitiert. Hierfür wurden NS verwendet, die aus mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden. Die verwendete Strahlendosis betrug 1 Gy bei Röntgenstrahlung, sowie 0,25 Gy oder 0,5 Gy bei der Exposition mit Kohlenstoff-Ionen.

hESC als *in vitro* Modell imitieren das Blastozysten Stadium eines etwa 5 Tage alten Embryos. In diesem Entwicklungsstadium stellen sie die Grundlage für die Entwicklung eines vollständigen Organismus dar. Dementsprechend ist die Bewahrung der genomischen Integrität von besonderer Wichtigkeit. Um diese aufrecht zu erhalten, besitzen hESC einzigartige Mechanismen, die eine Weitergabe von DNA-Schädigungen weitestgehend verhindern sollen. Dazu zählen einerseits eine effizientere Reparatur von DNA-Schädigungen und andererseits eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen [159, 160]. Auch in den hESC der Linie H9, die im Rahmen der hier dargestellten Experimente verwendet wurden, konnte eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen infolge einer Exposition mit ionisierender Strahlung nachgewiesen werden [84]. 24 Stunden nach der Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 1 Gy wurden 50 % der hESC mithilfe immunhistochemischer Methoden als Caspase 3

positiv und demnach als apoptotisch identifiziert [84]. Da bei dem Einsatz von Strahlendosen > 1 Gy zu viele hESC die Apoptose einleiten würden, so dass die nachfolgende Differenzierung zu NSC und NS problematisch wäre, wurde bei diesen Experimenten 1 Gy als maximale Strahlendosis gewählt.

5.4.1. Eine Exposition der hESC mit Röntgenstrahlung führt zu einer reduzierten Netzwerkaktivität ihrer Abkömmlinge

Zunächst werden die Ergebnisse diskutiert, die durch die NS erzielt wurden, die auf mit 1 Gy Röntgenstrahlung exponierten hESC basieren.

Dabei zeigte sich, dass die NS aus bestrahlten hESC elektrisch aktiv sind und dass diese Aktivität über denselben Zeitraum aufrechterhalten wird, wie es bei den Kontrollen der Fall war (Abbildung 4.22). Allerdings zeigte sich, dass diese NS im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte Netzwerkaktivität aufwiesen, die sich in einer geringeren Anzahl spontan generierter Spikes und Bursts manifestierte (Kapitel 4.4). In den Kontrollen erhöhte sich die Anzahl der Spikes bis Tag 10 um das Fünffache des Anfangswertes und die Anzahl der Bursts um das Zwanzigfache. Die Zunahme der elektrischen Signale in den NS aus bestrahlten hESC fiel deutlich geringer aus. Die Anzahl der Spikes verdoppelte sich bis Tag 4 und blieb an den nachfolgenden Tagen konstant auf diesem Niveau. Die Anzahl der Bursts erhöhte sich bis Tag 8 um den Faktor 12 und reduzierte sich an Tag 9 und 10 wieder auf das Niveau der ersten Tage.

Untersuchungen an dreidimensionalen Kardiomyozytenkulturen, die aus ESC der Maus differenziert wurden, zeigten ein ähnliches Verhalten nach Röntgenbestrahlung [161]. Mit steigender Strahlendosis verringerte sich sowohl der prozentuale Anteil kontraktile Kardiomyozytenkulturen, als auch ihr Durchmesser. Dies wurde auf eine durch Apoptose bedingte reduzierte Zellanzahl zum Zeitpunkt des Differenzierungsbeginnes zurückgeführt und resultierte in einer verzögerten kardialen Differenzierung. Weitere Studien berichteten von einem Zusammenhang zwischen der Zellanzahl zu Beginn der Differenzierung und dem Entwicklungsprozess [162, 163]. Bei der Analyse der elektrischen Signale der NS wurde die Summe aller Spikes und Bursts betrachtet, die von den Elektroden detektiert wurden. Eine Verringerung der Größe hätte demnach zur Folge, dass diese NS weniger Elektroden bedecken, so dass auch weniger elektrische Signale detektiert werden. Dies könnte ein möglicher Grund für die verringerte Netzwerkaktivität bei bestrahlten NS sein. Um dies auszuschließen, wurde der Differenzierungsprozess zu NS in den hier durchgeführten Experimenten stets mit einer konstanten Zellanzahl begonnen. Des Weiteren wurde die Größe der NS mithilfe der Software *ImageJ* analysiert. Hierfür wurden ihre Umrisse manuell markiert und die Fläche in mm^2 ermittelt.

Die Fläche der bestrahlten NS war jedoch mit $0,68 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ vergleichbar mit derjenigen der Kontrollen, die eine Fläche von $0,66 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ besaßen. Einen Einfluss der Größe der NS, auf die beobachtete Reduzierung der neuronalen Signale, kann dementsprechend ausgeschlossen werden.

Auffallend ist, dass die Entwicklung des elektrischen Aktivitätsmusters der bestrahlten und unbestrahlten NS bis zum vierten Tag nach Detektion der ersten Signale vergleichbar ist (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Während es bei den Kontrollen jedoch an den darauffolgenden Kultivierungstagen zu einem enormen Anstieg der Spikerate kam, verblieb die Anzahl der Spikes in den bestrahlten Proben bis zum Versuchsende an Tag 10 auf diesem Niveau. Dies deutet darauf hin, dass in den bestrahlten NS Entwicklungsprozesse beeinträchtigt sind, die normalerweise am Ende der ersten oder Anfang der zweiten Kultivierungswoche stattfinden.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Ausbildung der synaptischen Verbindungen in den bestrahlten NS eingeschränkt ist. Untersuchungen an 2D-Netzwerken kortikaler Neurone aus der Ratte zeigten, dass die Synapsendichte in der zweiten und dritten Kultivierungswoche signifikant ansteigt [111]. In dreidimensionalen, neuronalen Zellkulturmodellen, die aus humanen pluripotenten Karzinomzellen (NT2) differenziert wurden, untersuchten Terrasso et al. [164] ebenfalls die Entwicklung der Synapsendichte. Dabei wurde die Expression von Synaptophysin, einem in präsynaptischen Vesikeln lokalisierten Glycoprotein, 24 Tage nach Initiation der Differenzierung nachgewiesen. 38 Tage nach Differenzierungsbeginn wurde ein zehnfach erhöhtes Expressionslevel detektiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NS wurden 25 Tage nach Initiation der Differenzierung auf den MEA Chips positioniert. Dies entspricht der Zeitspanne, in der die Erhöhung der Synapsendichte stattfindet. Eine Beeinträchtigung dieser Entwicklung in den bestrahlten NS könnte eine Erklärung dafür sein, dass eine spontane Signalgenerierung stattfindet, diese jedoch ab dem vierten Tag der elektrischen Aktivität nicht weiter zunimmt, sondern auf einem konstanten Niveau verbleibt.

In der Literatur finden sich weitere Hinweise, die diese Annahme unterstützen. Die Synapsendichte ist unter anderem von der Morphologie, sowie der Komplexität der Dendriten abhängig. Des Weiteren stellen die Dornfortsätze der Dendriten die primären Empfänger exzitatorischer Signale des zentralen Nervensystems dar, so dass Veränderungen sowohl in der Dichte, als auch in der Morphologie der Dornfortsätze eine modifizierte synaptische Aktivität zur Folge haben können [142]. So wurde eine reduzierte Komplexität der Dendriten bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Epilepsie [165], Alzheimer [166] oder Chorea Huntington [167], festgestellt. Des Weiteren wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dendritischen Anomalien und Erkrankungen, die zu mentalen Beeinträchtigungen führen, nachgewiesen, wie beispielsweise beim Down-Syndrom [168], Rett-Syndrom [169] und beim Fragilem-X-Syndrom [170].

Eine Modifikation der dendritischen Komplexität, sowie der Dornfortsätze wurde ebenfalls infolge einer Exposition mit ionisierender Strahlung nachgewiesen. Parihar et al. [171] untersuchten die Auswirkungen einer kranialen Exposition mit 1 Gy oder 10 Gy γ -Strahlung auf den Hippocampus 2 Monate alter Mäuse. Dabei zeigte sich bei beiden Strahlendosen eine Reduktion der dendritischen Komplexität, sowie der Dichte der dendritischen Dornfortsätze. Dies wurde auf eine erhöhte Expression des postsynaptischen Proteins PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*) zurückgeführt. PSD-

95 ist an der Entwicklung der dendritischen Verästelungen, sowie an der Ausbildung der dendritischen Dornfortsätze beteiligt [172]. Bei einer Überexpression von PSD-95 werden diese Entwicklungsprozesse allerdings inhibiert [173]. Des Weiteren wurde eine reduzierte Expression des präsynaptischen Proteins Synaptophysin nachgewiesen. Diese strahleninduzierten Effekte wurden auch noch 1 Monat nach der Exposition detektiert.

In einer vergleichbaren Studie kamen Chakraborti et al. [174] zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier resultierte eine Exposition mit 10 Gy γ -Strahlung in einer reduzierten Dichte dendritischer Dornfortsätze im Hippocampus 2 Monate alter Mäuse. In dieser Studie wurde der strahleninduzierte Effekt ebenfalls auch noch 1 Monat nach Exposition nachgewiesen.

Obwohl die in diesen Studien verwendeten Zellkulturmodelle nicht mit den auf hESC basierenden NS, die im Rahmen der hier dargestellten Arbeit verwendet wurden, vergleichbar sind, könnte der zugrunde liegende Effekt derselbe sein. Um zu überprüfen, ob die verringerte neuronale Aktivität der NS, die aus bestrahlten hESC hergestellt wurden, ebenfalls auf eine reduzierte dendritische Komplexität und somit auf eine reduzierte Synapsendichte zurückzuführen ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine detaillierte immunhistochemische Analyse der Synapsendichte, sowie der dendritischen Verästelungen würde dabei helfen, die Ursachen der reduzierten neuronalen Aktivität aufzudecken.

Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Signalgenerierung der NS aus bestrahlten hESC könnte eine Beeinträchtigung der Differenzierung der hESC zu Neuronen sein.

Zumindest von NSC ist bekannt, dass eine Exposition mit ionisierender Strahlung eine Beeinträchtigung der Differenzierung zu Neuronen zur Folge hat. Acharya et al. [132] bestrahlten humane NSC mit 1, 2 oder 5 Gy γ -Strahlung und differenzierten die überlebenden Zellen zu Neuronen. Dabei zeigte sich, dass die NSC durchaus in der Lage sind zu Neuronen zu differenzieren, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Die Anzahl an Neuronen war 50 % geringer, als in den unbestrahlten Kontrollproben. Rola et al. [175] untersuchten den Einfluss einer Exposition mit 5 Gy Röntgenstrahlung auf die subgranuläre Zone von Mäusen. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Anzahl neu generierter Neurone 2 Monate nach der Exposition bis zu 86 % geringer war, als in den entsprechenden Kontrolltieren. In einer nachfolgenden Studie bestätigte sich dieses Ergebnis [176]. Ferner konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung die Differenzierung von NSC zu Astrozyten fördert. Bei auf hESC basierenden NSC, die eine Exposition mit 10 Gy Röntgenstrahlung überlebten, wurde die Expression des Astrozyten Markers S100 β in 80 % der Zellen nachgewiesen [177]. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression der Astrozyten Marker GFAP und Aquaporin 4 in Abkömmlingen muriner NSC, 7 Tage nach Exposition mit 10 Gy Röntgenstrahlung, nachgewiesen [178].

Eine verringerte Anzahl neuronaler Zellen könnte eine Erklärung für die reduzierte Signalgenerierung in den NS sein, die aus bestrahlten hESC hergestellt wurden. Es ist denkbar, dass diese beeinträchtigte Differenzierung durch oxidativen Stress bedingt ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass ionisierende Strahlung die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in hESC induziert [179].

Des Weiteren ist bekannt, dass die Produktion von ROS einen Einfluss auf Differenzierungsprozesse in ESC ausüben kann [180, 181]. So analysierten Ji et al. [180] unterschiedliche Pluripotenz- und Differenzierungsmarker in hESC bei steigenden ROS Konzentrationen. Dabei zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der mesodermalen und entodermalen Markerproteine, der mit einer reduzierten Expression der Pluripotenzmarker einhergeht. Schmelter et al. [182] zeigten, dass die kardiale Differenzierung von embryonalen Stammzellen bei mechanischer Beanspruchung über einen Signalweg erfolgt, in dem ROS eine fundamentale Aufgabe übernimmt. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten umfangreiche Untersuchungen bezüglich der ROS Konzentration nach Bestrahlung der hESC, sowie quantitative Analysen der neuronalen Zellen in den daraus resultierenden NS durchgeführt werden.

5.4.2. Eine Exposition der hESC mit Kohlenstoff-Ionen führt zu einer reduzierten Netzwerkaktivität ihrer Abkömmlinge

Im Rahmen dieser Arbeit konnten hESC am HIT mit Kohlenstoff-Ionen exponiert und die überlebenden Zellen anschließend zu NS differenziert werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es sich hierbei, aufgrund der geringen Probenanzahl ($n \leq 3$), nur um vorläufige Ergebnissen handelt. Dennoch ermöglichen sie es einen ersten Eindruck über potenzielle strahleninduzierte Effekte von Kohlenstoff-Ionen zu erhalten.

In diesem Experiment wurden hESC am HIT mit 0,25 Gy und 0,5 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlt und aus den überlebenden Zellen nachfolgend NS hergestellt. Für den Transport von der GSI zum HIT wurde ein Reiseinkubator verwendet, so dass zumindest die Temperatur konstant auf 37 °C gehalten wurde. Um einen Einfluss des Transportes auf die Ergebnisse des Experimentes auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollkulturen mitgeführt.

Aus den bestrahlten hESC wurden erfolgreich elektrisch aktive NS hergestellt, deren Aktivität über denselben Zeitraum detektiert werden konnte, wie bei den Kontrollproben (Abbildung 4.28). In einem nächsten Schritt wurden die vom Netzwerk spontan generierten Signale analysiert (Kapitel 4.5). Die Ergebnisse zeigen, dass die Kulturen starken tagesabhängigen Schwankungen unterliegen. Dennoch ist ein eindeutiger Trend zu erkennen. Bei Betrachtung der vom Netzwerk generierten Spikes zeigte sich, dass die Entwicklung in allen drei Versuchsgruppen bis Tag 6 vergleichbar ist. An den nachfolgenden Tagen erhöhte sich die Anzahl der Spikes in der Kontrollgruppe und erreichte an Tag 10 einen maximalen Wert von $3,54 \pm 0,6$. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anzahl der Spikes in den beiden exponierten Versuchsgruppen und fiel auf das Niveau des ersten Tages zurück. Bei Betrachtung der vom Netzwerk generierten Bursts ergibt sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 4.31). Die gravierenden tagesabhängigen Schwankungen erschweren auch in diesem Fall die Interpretation der Ergebnisse. Dennoch zeigte sich, dass der Anstieg der Burstanzahl in den beiden bestrahlten Versuchsgruppen

kontinuierlich geringer war (mit Ausnahme der mit 0,25 Gy exponierten Kulturen an Tag 3 und 4) als in der Kontrollprobe.

Generell kann festgehalten werden, dass die NS, die aus mit Kohlenstoff-Ionen exponierten hESC hergestellt wurden, einen ähnlichen Entwicklungsverlauf zeigen wie diejenigen, die auf mit Röntgenstrahlung exponierten hESC basieren. Demzufolge könnten dieselben oder ähnliche Mechanismen der reduzierten Signalgenerierung zugrunde liegen. In der Literatur finden sich Hinweise, dass auch Hoch-LET-Strahlung einen Einfluss auf Differenzierungsprozesse von hESC ausübt.

So untersuchten Rola et al. [183] den Einfluss einer Exposition mit 1-3 Gy Kohlenstoff-Ionen auf die Differenzierung von Neuronen in der subgranulären Zone des Hippocampus von Mäusen. Dabei zeigte sich, dass die Exposition eine Beeinträchtigung der Neurogenese zur Folge hat, die auch nach neun Monaten noch nachgewiesen wurde. Rivera et al. [184] analysierten die Anzahl unreifer Neurone, sowie die Anzahl von NSC in der subgranulären Zone des Hippocampus von Mäusen 24 Stunden und 3 Monate nach akuter oder fraktionierter Ganzkörperexposition mit Eisen-Ionen. Die Ergebnisse zeigten, dass zu beiden betrachteten Zeitpunkten die Anzahl unreifer Neurone geringer ist, als in den entsprechenden Kontrolltieren, obwohl die Anzahl der NSC durch die Bestrahlung nicht beeinflusst wurde.

In Kapitel 5.4.1 wurde bereits diskutiert, dass die eventuell beeinträchtigte neuronale Differenzierung der hESC durch oxidativen Stress bedingt sein könnte. Auch von Hoch-LET Strahlung ist bekannt, dass sie in den exponierten Zellen die Bildung von ROS bedingt. Limoli et al. [185] quantifizierten die ROS Bildung nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlendosen von Eisen-Ionen und verglichen die Ergebnisse mit denjenigen, die durch Röntgenstrahlung erzielt wurden. Dabei zeigte sich, dass eine Exposition mit 1 Gy Eisen-Ionen zu einer signifikant höheren ROS Bildung führt, als Röntgenstrahlung. Die strahleninduzierte Erhöhung der ROS Konzentration könnte die Genexpression modifizieren und somit Signalwege und Differenzierungsprozesse der hESC beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abkömmlinge der hESC, die eine Exposition mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen überlebten, durchaus in der Lage sind funktionale NS auszubilden. Dabei zeigte sich jedoch in beiden Fällen, dass die spontane Signalgenerierung dieser NS im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen beeinträchtigt war. Dies manifestierte sich in einer reduzierten Anzahl an Spikes und Bursts. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass hESC, obwohl sie zur Bewahrung der genomischen Integrität einzigartige Mechanismen besitzen (effiziente Reparatur von DNA-Schädigungen, hohe Apoptoserate [159, 160]), dennoch strahleninduzierte Schädigungen an ihre Tochterzellen weitergeben, die eine modifizierte Netzwerkaktivität in ihren Abkömmlingen bewirken. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass eine reduzierte Differenzierung der hESC zu Neuronen oder eine verringerte Ausbildung synaptischer Verbindungen der Grund für die reduzierte Signalgenerierung bei den NS sein könnte. Ob und inwieweit diese Annahmen zutreffen, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Exposition mit ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen) auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke untersucht. Dabei kam die Methode der MEA-Chips zum Einsatz, mit der die vom Netzwerk generierten Aktionspotentiale extrazellulär und somit nicht-invasiv detektiert werden konnten. In dieser Arbeit wurden zwei Zellkulturmodelle unterschiedlicher Komplexität verwendet.

Um die Auswirkung ionisierender Strahlung auf primäre, postmitotische Neurone zu untersuchen, wurden kortikale Rattenneurone verwendet. Dabei handelt es sich um ein stabiles und gut etabliertes 2D-Modellsystem, das insbesondere bei elektrophysiologischen Untersuchungen mit MEA-Chips weltweit zum Einsatz kommt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen auf den MEA-Chips kultiviert und zunächst elektrophysiologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der aktiven Elektroden, sowie die Anzahl der Spikes und Bursts im Laufe der Kultivierung deutlich zunahm, wobei letztere nach ca. 3 Wochen synchron an den Elektroden detektiert wurden. Um den Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologische Entwicklung des Netzwerks zu untersuchen, wurden die Zellen nach Detektion der ersten Spikes (16 *div*) mit Röntgenstrahlung exponiert und die elektrische Aktivität bis 26 *div* analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Funktionalität des neuronalen Netzwerks eine hohe Robustheit gegenüber Röntgenstrahlung aufwies und keiner der untersuchten Parameter durch die Exposition mit 1 Gy oder 2 Gy signifikant beeinflusst wurde. Da es sich bei den kortikalen Neuronen aus der Ratte um postmitotische Zellen handelt, denen eine hohe Strahlenresistenz zugesprochen wird, stimmen die Ergebnisse mit anderen Studien aus der Literatur überein.

Da diese Ergebnisse jedoch nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Modellsystem etabliert. Dabei handelt es sich um 3D-Neurosphären, die auf humanen embryonalen Stammzellen basieren. Dieses Modellsystem bietet viele Vorteile. Durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen, werden die *in vivo* vorhandenen Zell-Zell-Kontakte, sowie Zell-Matrix-Wechselwirkungen besser dargestellt, als in 2D-Zellmodellen. Des Weiteren handelt es sich um ein humanes Modellsystem, so dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erhöht wird [5]. Die elektrophysiologische Charakterisierung zeigte, dass auch in diesem Modellsystem die Anzahl aktiver Elektroden, sowie die Anzahl spontan generierter Spikes und Bursts im Laufe der Kultivierung anstieg. Eine Synchronisation der elektrischen Signale, wie sie bei den kortikalen Rattenneuronen auftrat, fand bei den NS nur selten statt. Ob dies durch die kurze Kultivierungszeit (ca. 3 Wochen) der NS auf den MEA-Chips bedingt ist oder ob es sich dabei um ein generelles Merkmal dreidimensionaler, neuronaler Kultursysteme handelt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Ein weiterer Vorteil dieses Modellsystems ist die Tatsache, dass die Differenzierung von hESC zu Neuronen kontrolliert gesteuert und die Exposition mit ionisierender Strahlung somit zu definierten Differenzierungsstadien durchgeführt werden kann. Um eine *in utero* Exposition zu imitieren, wurden daher hESC mit ionisierender Strahlung exponiert und die überlebenden Zellen als Grundlage für die Herstellung der NS verwendet. Das elektrische Aktivitätsmuster dieser NS wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen, nach Detektion der ersten Signale, analysiert.

Bei einem Vergleich der Netzwerkentwicklung mit entsprechenden Kontrollkulturen zeigte sich, ab dem vierten Tag der elektrischen Aktivität, eine reduzierte Signalgenerierung bei den NS, die aus mit Röntgenstrahlung exponierten hESC hergestellt wurden. Diese manifestierte sich sowohl in einer geringeren Anzahl an Spikes, als auch an Bursts. In einem ersten Experiment wurden des Weiteren hESC mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlt und nachfolgend zu NS differenziert. Obwohl es sich dabei nur um vorläufige Ergebnisse handelt, ist ein eindeutiger Trend erkennbar. Auch in diesem Experiment zeigten die NS, die aus mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten hESC hergestellt wurden, eine reduzierte Signalgenerierung, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollkulturen.

In der Literatur finden sich Hinweise, die diesen strahleninduzierten Effekt erklären könnten. So wäre es denkbar, dass in den NS aus bestrahlten hESC die Ausbildung synaptischer Verbindungen oder die Differenzierung der hESC zu Neuronen beeinträchtigt sein könnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Strahlendosen keinen Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften postmitotischer, kortikaler Rattenneurone hatten. Im Gegensatz dazu, wiesen dreidimensionale NS, die auf mit ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen) exponierten hESC basieren, durchaus gravierende Beeinträchtigungen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Entwicklung auf. Ob und inwieweit eine beeinträchtigte Differenzierung der hESC zu Neuronen oder eine verringerte Ausbildung synaptischer Verbindungen zwischen den Neuronen dafür verantwortlich ist, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden. Vor dem Hintergrund, dass die in dieser Arbeit verwendeten Strahlendosen in der Strahlentherapie von Tumoren Anwendung finden, sind die hier gezeigten Ergebnisse durchaus therapierelevant.

Literaturverzeichnis

1. Streffer, C., et al., *Biological effects after prenatal irradiation (embryo and fetus). A report of the International Commission on Radiological Protection*. Ann ICRP, 2003. **33**(1-2): p. 5-206.
2. *The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. ICRP publication 103. Ann ICRP, 2007. **37**(2-4): p. 1-332.
3. Schull, W.J. and M. Otake, *Cognitive Function and Prenatal Exposure to Ionizing Radiation*. Teratology, 1999. **59**: p. 222-226.
4. Verreet, T., et al., *A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis*. J Neurodev Disord, 2015. **7**(1): p. 3.
5. Antoni, D., et al., *Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(3): p. 5517-27.
6. Braun, D. and P. Fromherz, *Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon*. Physical Review Letters, 1998. **81**(23): p. 5241-5244.
7. Borkholder, D.A., *Cell Based Biosensors Using Microelectrodes*. Dissertation, Stanford University, 1998.
8. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.
9. Thomas, C.A., Jr., et al., *A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells*. Exp Cell Res, 1972. **74**(1): p. 61-6.
10. Pine, J., *Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes*. J Neurosci Methods, 1980. **2**(1): p. 19-31.
11. Potter, S.M. and T.B. DeMarse, *A new approach to neural cell culture for long-term studies*. J Neurosci Methods, 2001. **110**(1-2): p. 17-24.
12. Potter, S.M., *Distributed processing in cultured neuronal networks*. Prog Brain Res, 2001. **130**: p. 49-62.
13. Pancrazio, J.J., et al., *Development and application of cell-based biosensors*. Ann Biomed Eng, 1999. **27**(6): p. 697-711.
14. Nordhausen, C.T., P.J. Rousche, and R.A. Normann, *Optimizing recording capabilities of the Utah Intracortical Electrode Array*. Brain Res, 1994. **637**(1-2): p. 27-36.
15. Normann, R., P. Campbell, and K. Jones, *Micromachined, silicon based electrode arrays for electrical stimulation of or recording from cerebral cortex*. Proceedings of the International Conference of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems. IEEE, 1991: p. 247-252.
16. Cheung, K.C., *Implantable microscale neural interfaces*. Biomed Microdevices, 2007. **9**(6): p. 923-38.
17. Otto, F., et al., *Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays*. J Neurosci Methods, 2003. **128**(1-2): p. 173-181.

18. Hogberg, H.T., et al., *Application of micro-electrode arrays (MEAs) as an emerging technology for developmental neurotoxicity: Evaluation of domoic acid-induced effects in primary cultures of rat cortical neurons*. Neuro Toxicology, 2011. **32**(1): p. 158-168.
19. Wallace, K., et al., *A multiplexed assay for determination of neurotoxicant effects on spontaneous network activity and viability from microelectrode arrays*. Neurotoxicology, 2015. **49**: p. 79-85.
20. Colombi, I., et al., *Effects of antiepileptic drugs on hippocampal neurons coupled to micro-electrode arrays*. Front Neuroeng, 2013. **6**: p. 10.
21. Cukierman, E., et al., *Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension* Science, 2001. **294**(5547): p. 1708-1712.
22. Hindie, M., et al., *Interactions of B16F10 melanoma cells aggregated on a cellulose substrate*. J Cell Biochem, 2006. **99**(1): p. 96-104.
23. Friedl, P., K.S. Zanker, and E.-B. Bröcker, *Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function*. Microscopy Research and Technique, 1998. **43**(5): p. 369-378.
24. Birgersdotter, A., R. Sandberg, and I. Ernberg, *Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 405-12.
25. Chun, T.H., et al., *A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue*. Cell, 2006. **125**(3): p. 577-91.
26. Frega, M., et al., *Network dynamics of 3D engineered neuronal cultures: a new experimental model for in-vitro electrophysiology*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5489.
27. Daus, A.W., P.G. Layer, and C. Thielemann, *A spheroid-based biosensor for the label-free detection of drug-induced field potential alterations*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **165**(1): p. 53-58.
28. Mayer, M., et al., *Human neurospheres on microelectrode arrays: a model to investigate ionizing radiation effects on neuronal network communication*. GSI Scientific report, 2014: p. 305-306.
29. Heikkila, T.J., et al., *Human embryonic stem cell-derived neuronal cells form spontaneously active neuronal networks in vitro*. Exp Neurol, 2009. **218**(1): p. 109-16.
30. Yla-Outinen, L., et al., *Human cell-based micro electrode array platform for studying neurotoxicity*. Front Neuroeng, 2010. **3**: p. 111.
31. Smith, I., et al., *Human neural stem cell-derived cultures in three-dimensional substrates form spontaneously functional neuronal networks*. J Tissue Eng Regen Med, 2017. **11**(4): p. 1022-1033.
32. Mayer, M., et al., *Human embryonic stem cell derived neurospheres form functional networks on microelectrode arrays*. GSI Scientific report, 2015: p. 205.
33. Frieß, J.W., et al., *Electrophysiologic and cellular characteristics of cardiomyocytes after X-ray irradiation*. Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2015. **777**: p. 1-10.
34. Haeckel, E., *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Georg Reimer Verlag, Berlin, 1868.

-
35. Haeckel, E., *Anthropogenie*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1874.
 36. Ramalho-Santos, M. and H. Willenbring, *On the origin of the term "stem cell"*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 35-8.
 37. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells*. Radiation Research, 1961. **14**: p. 213-222.
 38. Becker, A.J., E.A. McCulloch, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**(4866): p. 452-454.
 39. Schmitz, S., *Der Experimentator, Zellkultur*. Spektrum akademischer Verlag, 2011. **3. Auflage**.
 40. Will, H., *Molekularbiologie kurz und bündig*. Springer Verlag, 2014.
 41. Wintermantel, E. and S.W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Springer Verlag, 2009. **5. Auflage**.
 42. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
 43. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
 44. Doetschman, T., P. Williams, and N. Maeda, *Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells*. Dev Biol, 1988. **127**(1): p. 224-7.
 45. Graves, K.H. and R.W. Moreadith, *Derivation and characterization of putative pluripotent embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos*. Mol Reprod Dev, 1993. **36**(4): p. 424-33.
 46. Evans, M.J., et al., *Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts*. Theriogenology, 1990. **33**(1): p. 125-128.
 47. Notarianni, E., et al., *Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **43**: p. 255-60.
 48. Thomson, J.A., et al., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. Developmental Biology, 1995. **92**: p. 7844-7848.
 49. Thomson, J.A., et al., *Embryonic Stem Cell Lines derived from human blastocysts*. Science Translational Medicine, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
 50. *Embryonenschutzgesetz vom 13.12.1990 (BGBl. I S.2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist*. URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/eschg/BJNR027460990.html>, (besucht am 20.09.2017).
 51. *Stammzellgesetz vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), das zuletzt durch Artikel 50 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist*. URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/stzg/index.html>, (besucht am 20.09.2017).
 52. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
-

53. Sullivan, G.J., et al., *Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(12): p. 880-5.
54. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. Sinauer Verlag, 8. Edition.
55. Bear, M.F., B.W. Connors, and M.A. Paradiso, *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. Spektrum akademischer Verlag, 2008. **3. Auflage**.
56. Forsting, M. and O. Jansen, *MRT des Zentralnervensystems*. Thieme Verlag, 2006. **2. Auflage**.
57. Gregg, C.T., A.K. Chojnacki, and S. Weiss, *Radial glial cells as neuronal precursors: the next generation?* J Neurosci Res, 2002. **69**(6): p. 708-13.
58. Haubensak, W., et al., *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3196-201.
59. Ribera, A.B., *Potassium currents in developing neurons*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **868**: p. 399-405.
60. Behrends, J.C., et al., *Physiologie*. Thieme Verlag, 2010.
61. *generation of an action potential*. URL: <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-2-detecting-and-respond/coordination--regulation/nervous-system.html> (besucht am 20.09.2017).
62. Lisman, J., *Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable*. Trends in Neurosciences, 1997. **20**(1): p. 38-43.
63. Ben-Ari, Y., *Developing networks play a similar melody*. Trends Neurosci., 2001. **24**(6): p. 353-360.
64. Singer, W., *Neuronal Synchrony: A Versatile Code for the Definition of Relations?* . Neuron, 1999. **24**: p. 49-65.
65. Buzsaki, G. and A. Draguhn, *Neuronal Oscillations in Cortical Networks*. Science, 2004. **304**: p. 1926-1929.
66. Wagenaar, D.A., et al., *Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation*. J Neurosci, 2005. **25**(3): p. 680-8.
67. Odawara, A., et al., *Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26181.
68. Illes, S., et al., *Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 93.
69. Corner, M.A., et al., *Physiological effects of sustained blockade of excitatory synaptic transmission on spontaneously active developing neuronal networks - an inquiry into the reciprocal linkage between intrinsic biorhythms and neuroplasticity in early ontogeny*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2002. **26**: p. 127-185.
70. Kapur, A. and L.B. Haberly, *Durition of NMDA-Dependent Synaptic Potentiation in Piriform Cortex In Vivo is Increased After Epileptiform Bursting*. Journal of Neurophysiology, 1998. **80**(4): p. 1623-1629.

-
71. Litt, B. and J. Echauz, *Prediction of epileptic seizures*. The Lancet Neurology, 2002. **1**(1): p. 22-30.
 72. Massobrio, P., et al., *In vitro studies of neuronal networks and synaptic plasticity in invertebrates and in mammals using multielectrode arrays*. Neural Plast, 2015. **2015**: p. 196195.
 73. Krieger, H., *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Springer Verlag, 4. Auflage.
 74. Scholz, M., *Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues* Advances in Polymer Science, 2003. **162**: p. 95-155.
 75. Kraft, G., M. Krämer, and M. Scholz, *LET, track structure and models*. Radiat Environ Biophys, 1992. **31**: p. 161-180.
 76. Kraft, G., *Tumorthrapy with ion beams*. Nuclear instruments and Methods in Physics Research A, 2000. **454**: p. 1-10.
 77. Williams, P.M. and S.F. Capt, *Health Effects of Prenatal Radiation Exposure*. American Family Physician, 2010. **85**(5): p. 488-493.
 78. Opalka, L., et al., *Linear energy transfer and track pattern recognition of secondary radiation generated in hadron therapy beam in a PMMA target*. Journal of Instrumentation, 2013. **8**(02): p. C02047-C02047.
 79. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit. Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2014, 2014.
 80. Giles, D., et al., *Malignant disease in childhood and diagnostic irradiation in utero*. Lancet, 1956. **271**(6940): p. 447.
 81. Ozasa, K., *Epidemiological research on radiation-induced cancer in atomic bomb survivors*. J Radiat Res, 2016. **57 Suppl 1**: p. i112-i117.
 82. *Strahlenschutzverordnung vom 20. Juli 2001 (BGBl. I S. 1714; 2002 I S. 1459), die zuletzt durch nach Maßgabe des Artikel 10 durch Artikel 6 des Gesetzes vom 27. Januar 2017 (BGBl. I S. 114, 1222) geändert worden ist*. URL: http://www.gesetze-im-internet.de/strlschv_2001/, (besucht am 20.09.2017).
 83. Munter, M.W., et al., *Heavy ion radiotherapy during pregnancy*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2329 e5-7.
 84. Luft, S., et al., *Ionizing Radiation Alters Human Embryonic Stem Cell Properties and Differentiation Capacity by Diminishing the Expression of Activin Receptors*. Stem Cells Dev, 2017. **26**(5): p. 341-352.
 85. Luft, S., *Impact of ionizing radiation on human embryonic stem cells*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2015.
 86. Bestel, R., *Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren*. Bachelorarbeit, Hochschule Aschaffenburg, BioMEMS Lab, 2010.
 87. Steininger, J., *Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren*. Diplomarbeit, Hochschule Aschaffenburg, BioMEMS Lab, 2005.
-

88. Nick, C., et al., *DrCell - A Software Tool for the Analysis of Cell Signals Recorded with Extracellular Microelectrodes*. Signal Processing: An International Journal (SPIJ), 2013. 7(2): p. 96-109.
89. Mack, C.M., et al., *Burst and principal components analyses of MEA data for 16 chemicals describe at least three effects classes*. Neurotoxicology, 2014. 40: p. 75-85.
90. Baker, R.E., M.A. Corner, and J. van Pelt, *Spontaneous neuronal discharge patterns in developing organotypic mega-co-cultures of neonatal rat cerebral cortex*. Brain Res, 2006. 1101(1): p. 29-35.
91. Selinger, J.V., et al., *Methods for characterizing interspike intervals and identifying bursts in neuronal activity*. J Neurosci Methods, 2007. 162(1-2): p. 64-71.
92. Wagenaar, D., T.B. DeMarse, and S.M. Potter, *MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis*. 2005: p. 518-521.
93. Chiappalone, M., et al., *Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons*. Neurocomputing, 2005. 65-66: p. 653-662.
94. Lieb, F., H.G. Stark, and C. Thielemann, *A stationary wavelet transform and a time-frequency based spike detection algorithm for extracellular recorded data*. J. Neural Eng., 2017. 14(3): p. 036013.
95. Sánchez, C., J. Diaz-Nido, and J. Avila, *Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function*. Progress in Neurobiology, 2000. 61: p. 133-168.
96. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. 25(9-10): p. 1439-51.
97. Mayer, M., et al., *Electrophysiological investigation of human embryonic stem cell derived neurospheres using a novel spike detection algorithm*. Biosensor and Bioelectronics (accepted for publication 09/2017), 2017.
98. Suresh, S.H., et al., *Efficacy and Safety of Levetiracetam and Carbamazepine as Monotherapy in Partial Seizures*. Epilepsy Res Treat, 2015. 2015: p. 415082.
99. Hänsel, R. and O. Sticher, *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010. 9. Auflage.
100. Ueno, S., et al., *Bicuculline and Gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the Gaba_A receptor*. The Journal of Neuroscience, 1997. 17(2): p. 625-634.
101. Verheyde, J. and M.A. Benotmane, *Unraveling the fundamental molecular mechanisms of morphological and cognitive defects in the irradiated brain*. Brain Res Rev, 2007. 53(2): p. 312-20.
102. Lamproglou, I., et al., *Radiation-induced cognitive dysfunction: an experimental model in the old rat*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995. 31(1): p. 65-70.
103. Yoneoka, Y., et al., *An experimental study of radiation-induced cognitive dysfunction in an adult rat model*. Br J Radiol, 1999. 72(864): p. 1196-201.
104. Brown, W.R., et al., *Capillary loss precedes the cognitive impairment induced by fractionated whole-brain irradiation: a potential rat model of vascular dementia*. J Neurol Sci, 2007. 257(1-2): p. 67-71.

-
105. Shi, L., et al., *Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus*. Radiat Res, 2006. **166**(6): p. 892-9.
 106. Hackam, D.G., *Translating animal research into clinical benefit*. BMJ, 2007. **334**(7586): p. 163-164.
 107. Brent, R.L., *Utilization of Animal Studies to Determine the Effects and Human Risks of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals and Physical Agents)*. Pediatrics, 2004. **113**(4): p. 984-995.
 108. Mummery, C.L., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview*. Circ Res, 2012. **111**(3): p. 344-58.
 109. Muguruma, K. and Y. Sasai, *In vitro recapitulation of neural development using embryonic stem cells: from neurogenesis to histogenesis*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(3): p. 349-57.
 110. Kriegstein, A.R. and M.A. Dichter, *Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture*. The journal of neuroscience, 1983. **3**(8): p. 1634-1647.
 111. De Lima, A.D., M.D.P. Merten, and T. Voigt, *Neuritic differentiation and synaptogenesis in serum-free neuronal cultures of the rat cerebral cortex* The Journal of comparative neurology, 1997. **382**: p. 230-246.
 112. Maeda, E., H.P.C. Robinson, and A. Kawana, *The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons*. The Journal of Neuroscience, 1995. **15**(10): p. 6834-6845.
 113. Pasquale, V., et al., *Self-organization and neuronal avalanches in networks of dissociated cortical neurons*. Neuroscience, 2008. **153**(4): p. 1354-69.
 114. Jimbo, Y., T. Tateno, and H.P.C. Robinson, *simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons*. Biophysical Journal, 1999. **76**: p. 670-678.
 115. Maeda, E., et al., *Modification of parallel activity elicited by propagating bursts in developing networks of rat cortical neurons* European Journal of Neuroscience, 1998. **10**: p. 488-496.
 116. Chiappalone, M., et al., *Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications*. Biosens Bioelectron, 2003. **18**(5-6): p. 627-34.
 117. Johnstone, A.F., et al., *Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century*. Neurotoxicology, 2010. **31**(4): p. 331-50.
 118. Kamioka, H., et al., *Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures*. Neurosci Lett, 1996. **206**(2-3): p. 109-12.
 119. Tateno, T., A. Kawana, and Y. Jimbo, *Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2002. **65**(5 Pt 1): p. 051924.
 120. Dichter, M.A., *Rat cortical neurons in cell culture: Culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation*. Brain Research, 1978. **149**(2): p. 279-293.
 121. Wagenaar, D.A., J. Pine, and S.M. Potter, *An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures*. BMC Neurosci, 2006. **7**: p. 11.
-

122. Chiappalone, M., et al., *Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development*. Brain Res, 2006. **1093**(1): p. 41-53.
123. Biffi, E., et al., *The influence of neuronal density and maturation on network activity of hippocampal cell cultures: a methodological study*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83899.
124. Cohen, E., et al., *Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus*. Brain Res, 2008. **1235**: p. 21-30.
125. Ordy, J.M., et al., *Changes in memory, electrophysiology neurochemistry and neuronal ultrastructure after deuteron irradiation of the brain in C57B1 10 mice*. Journal of Neurochemistry, 1968. **15**: p. 1245-1256.
126. Bassant, M.H. and L. Court, *Effects of whole-body gamma irradiation on the activity of rabbit hippocampal neurons*. Radiat Res, 1978. **75**(3): p. 593-606.
127. Pellmar, T.C. and D.L. Lepinski, *Gamma radiation (5-10 Gy) impairs neuronal function in the guinea pig hippocampus*. Radiat Res, 1993. **136**(2): p. 255-261.
128. Pellmar, T.C., D.A. Schauer, and G.H. Zeman, *Time-and Dose-Dependent Changes in Neuronal activity produced by x radiation in brain slices*. Radiation Research, 1990. **122**: p. 209-214.
129. Vlkolinsky, R., et al., *Effects of lipopolysaccharide on ⁵⁶Fe-particle radiation-induced impairment of synaptic plasticity in the mouse hippocampus*. Radiat Res, 2007. **168**(4): p. 462-70.
130. Rudobeck, E., et al., *(28)silicon radiation impairs neuronal output in CA1 neurons of mouse ventral hippocampus without altering dendritic excitability*. Radiat Res, 2014. **181**(4): p. 407-15.
131. Clelland, C.D., et al., *A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation*. Science, 2009. **325**(5937): p. 210-3.
132. Acharya, M.M., et al., *Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(12): p. 1846-55.
133. von Bohlen Und Halbach, O., *Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2007. **329**(3): p. 409-20.
134. Menezes, J.R.L. and M.B. Luskin, *Expression of Neuron-Specific Tubulin Defines a Novel Population in the Proliferative Layers of the Developing Telencephalon*. The Journal of Neuroscience, 1994. **14**(9): p. 5399-5416.
135. Sinclair, W.K. and R.A. Morton, *X-ray and Ultraviolet Sensitivity of Synchronized Chinese Hamster Cells at Various Stages of the Cell Cycle* Biophysical Journal, 1965. **5**.
136. Peißner, W., et al., *Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus*. Molecular Brain Research, 1999. **71**: p. 61-68.
137. Borges, H.L., et al., *Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53*. Cell Death Differ, 2004. **11**(5): p. 494-502.
138. Noel, F. and P.J. Tofilon, *Astrocytes protect against X-ray-induced neuronal toxicity in vitro*. NeuroReport 1998. **9**(1133-1137).

139. Gobel, G.T., et al., *Response of Postmitotic Neurons to X-irradiation: Implications for the Role of DNA Damage in Neuronal Apoptosis* The Journal of Neuroscience, 1998. **18**(1): p. 147-155.
140. Enokido, Y., et al., *Involvement of p53 in DNA Strand Break-induced Apoptosis in Postmitotic CNS Neurons*. European Journal of Neuroscience, 1996. **8**: p. 1812-1821.
141. Shirai, K., et al., *X irradiation changes dendritic spine morphology and density through reduction of cytoskeletal proteins in mature neurons*. Radiat Res, 2013. **179**(6): p. 630-6.
142. Segal, M., *Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(12): p. 2178-84.
143. Roch-Lefvre, S., et al., *Suitability of the γ -H2AX Assay for Human Radiation Biodosimetry*. Radiation Research, 2012. **174**(2): p. 185-194.
144. Rogakou, E.P., et al., *DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. The journal of biological chemistry, 1998. **273**(10): p. 5858-5868.
145. Rogakou, E.P., et al., *Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo*. The Journal of Cell Biology, 1999. **146**(5): p. 905-915.
146. Aten, J.A., et al., *Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains*. Science, 2004. **303**(5654): p. 92-5.
147. Grudzenski, S., et al., *Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14205-10.
148. Ghardi, M., et al., *Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells*. Int J Mol Med, 2012. **29**(5): p. 769-80.
149. Fuchs, E., et al., *Coemergence of regularity and complexity during neural network development*. Dev Neurobiol, 2007. **67**(13): p. 1802-14.
150. Illes, S., et al., *Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity*. Exp Neurol, 2007. **207**(1): p. 171-6.
151. Kirwan, P., et al., *Development and function of human cerebral cortex neural networks from pluripotent stem cells in vitro*. Development, 2015. **142**(18): p. 3178-87.
152. Tolonen, M., et al., *Development of the spontaneous activity transients and ongoing cortical activity in human preterm babies*. Neuroscience, 2007. **145**(3): p. 997-1006.
153. Moore, A.R., et al., *Spontaneous electrical activity in the human fetal cortex in vitro*. J Neurosci, 2011. **31**(7): p. 2391-8.
154. Gonzalez-Burgos, G. and D.A. Lewis, *GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia*. Schizophr Bull, 2008. **34**(5): p. 944-61.
155. Moody, W.J. and M.M. Bosma, *Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 883-941.

156. Ben-Ari, Y., et al., *GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1215-84.
157. Baltz, T., A.D. de Lima, and T. Voigt, *Contribution of GABAergic interneurons to the development of spontaneous activity patterns in cultured neocortical networks*. *Front Cell Neurosci*, 2010. **4**: p. 15.
158. Jungblut, M., et al., *Triangular neuronal networks on microelectrode arrays: an approach to improve the properties of low-density networks for extracellular recording*. *Biomed Microdevices*, 2009. **11**(6): p. 1269-78.
159. Frosina, G., *The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 845396.
160. Sokolov, M.V. and R.D. Neumann, *Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 579104.
161. Helm, A., et al., *Ionizing Radiation Impacts on Cardiac Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells*. *Stem Cells Dev*, 2016. **25**(2): p. 178-88.
162. Messana, J.M., et al., *Size of the embryoid body influences chondrogenesis of mouse embryonic stem cells*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(8): p. 499-506.
163. Preda, M.B., A. Burlacu, and M. Simionescu, *Defined-size embryoid bodies formed in the presence of serum replacement increases the efficiency of the cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells*. *Tissue Cell*, 2013. **45**(1): p. 54-60.
164. Terrasso, A.P., et al., *Novel scalable 3D cell based model for in vitro neurotoxicity testing: Combining human differentiated neurospheres with gene expression and functional endpoints*. *J Biotechnol*, 2015. **205**: p. 82-92.
165. Nishimura, M., X. Gu, and J.W. Swann, *Seizures in early life suppress hippocampal dendrite growth while impairing spatial learning*. *Neurobiol Dis*, 2011. **44**(2): p. 205-14.
166. Terry, R.D., et al., *Some Morphometric Aspects of the Brain in Senile Dementia of the Alzheimer Type*. *Ann Neurol* 1981. **10**(2): p. 184-192.
167. Graveland, G.A., R.S. Williams, and M. DiFiglia, *Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington 's disease*. *Science*, 1985. **227**(4688): p. 770-773.
168. Takashima, S., et al., *Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome*. *J Intellect Disabil Res*, 1994. **38 (Pt 3)**: p. 265-73.
169. Armstrong, D.D., K. Dunn, and B. Antalffy, *Decreased Dendritic Branching in Frontal, Motor and Limbic Cortex in Rett Syndrome Compared with Trisomy 21*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1998. **57**(11): p. 1013-1017.
170. Kaufmann, W.E. and H.W. Moser, *Dendritic Anomalies in Disorders Associated with Mental Retardation*. *Cereb Cortex*, 2000. **10**: p. 981-991.
171. Parihar, V.K. and C.L. Limoli, *Cranial irradiation compromises neuronal architecture in the hippocampus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(31): p. 12822-12827.

-
172. Woods, G.F., et al., *Loss of PSD-95 enrichment is not a prerequisite for spine retraction*. J Neurosci, 2011. **31**(34): p. 12129-38.
173. Charych, E.I., et al., *Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95*. J Neurosci, 2006. **26**(40): p. 10164-76.
174. Chakraborti, A., et al., *Cranial irradiation alters dendritic spine density and morphology in the hippocampus*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40844.
175. Rola, R., et al., *Lack of EC-SOD in the Microenvironment Impacts Radiation-Induced Changes in Neurogenesis*. Free Radic Biol Med., 2007. **42**(8): p. 1133-1132.
176. Fishman, K., et al., *Radiation-induced reductions in neurogenesis are ameliorated in mice deficient in CuZnSOD or MnSOD*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(10): p. 1459-67.
177. Zou, Y., et al., *Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **426**(1): p. 100-5.
178. Schneider, L., et al., *DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT*. Stem Cell Reports, 2013. **1**(2): p. 123-38.
179. Lan, M.L., et al., *Characterizing the radioresponse of pluripotent and multipotent human stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50048.
180. Ji, A.R., et al., *Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage*. Exp Mol Med, 2010. **42**(3): p. 175-86.
181. Bigarella, C.L., R. Liang, and S. Ghaffari, *Stem cells and the impact of ROS signaling*. Development, 2014. **141**(22): p. 4206-18.
182. Schmelter, M., et al., *Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1182-4.
183. Rola, R., et al., *High-LET Radiation Induces Inflammation and Persistent Changes in Markers of Hippocampal Neurogenesis*. Radiation Research, 2005. **164**(4): p. 556-560.
184. Rivera, P.D., et al., *Acute and fractionated exposure to high-LET (56)Fe HZE-particle radiation both result in similar long-term deficits in adult hippocampal neurogenesis*. Radiat Res, 2013. **180**(6): p. 658-67.
185. Limoli, C.L., et al., *Redox changes induced in hippocampal precursor cells by heavy ion irradiation*. Radiat Environ Biophys, 2007. **46**(2): p. 167-72.

Materialliste

In folgendem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, in der Zellkultur eingesetzte Medien, Lösungen und Zusätze, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte und Software aufgelistet.

Allgemeine Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav DB-23	Systec, Linden
CO ₂ -Inkubator C-150	Binder GmbH, Tuttlingen
CO ₂ -Inkubator BC-190	SalvisLab, Rotkreuz, Schweiz
Dosimeter Diados	PTH, Freiburg
Dosimeter SN4	PTW, Freiburg
Feinwaage PCB 350-3	Kern und Sohn GmbH, Batlingen
Fluoreszenzmikroskop <i>Eclipse</i> Ti	Nikon, Düsseldorf
Gefahrstoffabzug Delta System 30	Wesemann, Syke
Laminar Flow-Werkbank (B-[Max-Pro] ² -130)	Berner, Elmshorn
Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert, Mannheim
Röntgenröhre MCN 165/796704	Philips, Hamburg
Kühlschrank mit Tiefkühlfächern	Bosch, Nürnberg
Laborzentrifuge Heraeus Labofuge 400R	Thermo Scientific, Langenselbold
Magnetrührer	Variomag, Daytona Beach, USA
Mikroskop Labovort FS	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini-Zentrifuge Rotilabo	Roth, Karlsruhe
PC-Einsteckkarte PCI 6255	<i>National Instruments Germany</i> GmbH, München
Reinstwasseranlage Purelab flex 3	Elga LabWater, Lane End, UK
Rotationsschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortex-Schüttler	VWR, Darmstadt
Vorverstärker MEA1060	<i>Multichannel Systems</i> , Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well Zellkulturplatten (<i>ultra-low attachment</i>)	Corning, New York, USA
12-Well Zellkulturplatten	Roth, Karlsruhe
24-Well Zellkulturplatten	Roth, Karlsruhe
Glas Coverslips (Ø 12 und 18 mm)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (Ø 35 und 60 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 100 und 1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
T25 Zellkulturflaschen	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Roth, Karlsruhe
MEA Chips (60 MEA 200/30iR-Ti-gr)	Multichannel Systems, Reutlingen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
4,6-Diamidino-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Accutase	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
β-mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (70 %)	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaiser's Glyceringelatine	VWR, Darmstadt
PBS	Roth, Karlsruhe
ReLeSR	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd 4 %	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tergazym	Alconox, New York, USA
Bicucullin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Carbamazepin

Sigma-Aldrich, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Materialien für die Zellkultur

Tabelle 4: Verwendete Medien

Medium	Hersteller
DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Knockout DMEM Medium	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
PNBM Medium	Lonza, Basel, Schweiz
Gibco™ neurales Induktionsmedium	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Tabelle 5: Verwendete Zusätze

Zusatz	Hersteller
B27 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Knockout Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
bFGF	Peprtech, Rocky Hill, USA
Noggin	Peprtech, Rocky Hill, USA
Dorsomorphin	Tocris, Bristol, UK
ROCK inhibitor Y-27632	Tocris, Bristol, UK
Geltrex	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Penicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim
NSF-1	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen

Medium	Zusammensetzung
H9-Medium	Knockout DMEM Medium, 20 % Knockout Serum Replacement, 1 mM L-Glutamin, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 100 μ M β -mercaptoethanol, 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin
MEF konditioniertes Medium	H9-Medium, 10 ng/ml FGF2 Inkubation für 24 h mit 47000 MEF/cm ²
NS-B27 Medium	DMEM/F12 Medium, 0.5 mM L-Glutamin und B27 Supplement, 20 ng/ml bFGF, 600 nM Dorsomorphin, 84 ng/ml Noggin
PNGM Medium	PNBM Medium, 2 mM L-Glutamin, 50 μ g/ml Gentamicin, 37 ng/ml Amphotericin, 2 % NSF-1
Borsäurepuffer	3,1 g Borsäure, 4,75 g Natriumtetraborat ad 1 L mit dH ₂ O, pH 8,4

Tabelle 7: Verwendete Zellkulturen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kortikale Neurone aus der Ratte (RCX)	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
WA09 (H9) Stammzellen	WiCell, Madison, USA

Materialien für die Immunhistochemie

Tabelle 8: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Blocklösung	5 % BSA (w/v), 0,1 % Triton (v/v) in 1 x PBS

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Epitop	Hersteller	Verwendete Verdünnung	Spezies
α - β -III Tubulin	Abcam, Cambridge, UK	1:1000	Maus
α - γ H2AX	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:200	Maus
α -GFAP	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:200	Kaninchen
α -MAP2	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:200	Kaninchen
α -Nestin	Life Technologies, Carlsbad, USA	1:50	Maus

α -Oct4	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:100	Maus
α -Sox2	Life Technologies, Carlsbad, USA	1:50	Kaninchen
α -MBP	Abcam, Cambridge, UK	1:200	Kaninchen

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Fluorophor – Host α epitop	Hersteller	Verwendete Verdünnung	Host
Alexa 594 d α m	Abcam, Cambridge, UK	1:200	Esel
Alexa 594 g α rb	Abcam, Cambridge, UK	1:200	Ziege

Curriculum Vitae

Persönliches

Name: Margot Mayer
Adresse: Auf der Schulwiese 28
63303 Dreieich
Geburtstag: 04.12.1987
Nationalität: deutsch
E-Mail: margot_mayer@gmx.de



Bildungsweg

Seit 12 / 2012 **Promotion an der Hochschule Aschaffenburg in Kooperation mit der Technischen Universität Darmstadt**
Thema: Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften sich entwickelnder neuronaler Netzwerke

11 / 2015 **Fortbildung zum Projektleiter und Beauftragten für biologische Sicherheit**

01 – 11 / 2012 **Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt**
Thema: Untersuchungen zur strahleninduzierten Apoptose in der embryonalen Hühnerretina

10 / 2007 – 11 / 2012 **Biologie Studium (Diplom), Technische Universität Darmstadt**
Schwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Tier- und Pflanzenphysiologie

09 / 1998 – 06 / 2007 **Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Frankfurt am Main**
Abschluss: Abitur (Note 1,8)

Beruflicher Werdegang

Seit 12 / 2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion) im BioMEMS Labor der Hochschule Aschaffenburg** mit dem Schwerpunkt „Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften neuronaler Netzwerke“

10 / 2010 – 02 / 2012 **Hilfswissenschaftler und Betreuer** im Tier- und Pflanzenphysiologischen Grundpraktikum, Technische Universität Darmstadt

07 / 2010 – 11 / 2011 **Werkstudent beim Julius Kühn-Institut, Darmstadt**
Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe „Naturstoffe“

Publikationen

M. Mayer, O. Arrizabalaga, F. Lieb, M. Ciba, S. Ritter and C. Thielemann (2017) Electrophysiological investigation of human embryonic stem cell derived neurospheres using a novel spike detection algorithm, Biosensors and Bioelectronics (accepted)

M. Mayer, O. Arrizabalaga, J. Kunz, S. Ritter and C. Thielemann (2016) Characterization of neurospheres generated from irradiated human embryonic stem cells, GSI Scientific report (accepted)

M. Mayer, N. Kaiser, P. G. Layer, F. Frohns (2016) Cell Cycle Regulation and Apoptotic Responses of the Embryonic Chick Retina by Ionizing Radiation, PLoS ONE 11(5)

M. Mayer, O. Arrizabalaga, S. Ritter and C. Thielemann (2016) Human Embryonic Stem Cell Derived Neurospheres – A Novel Three Dimensional Model For Neurotoxicological Studies. Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2016

M. Mayer, O. Arrizabalaga, S. Ritter and C. Thielemann (2015) Human embryonic stem cell derived neurospheres form functional networks on microelectrode arrays, GSI Scientific report, 205

O. Arrizabalaga, S. Sadeghi, M. Mayer, J. Bauer and S. Ritter (2015) Establishment of human embryonic neural stem cells as in vitro model for radiation risk assessment, GSI Scientific report, 201

M. Mayer, B. Müller, S. Kadereit, S. Ritter and C. Thielemann (2014) Human neurospheres on microelectrode arrays: a model to investigate ionizing radiation effects on neuronal network communication, GSI Scientific report, 305

M. Mayer, S. Ritter and C. Thielemann (2013) Electrophysiological Effects of Ionising Radiation on Cortical Rat Neurons in vitro, GSI Scientific report, 218

F. Frohns, M. Mayer, M. Durante, C. Fournier and P. G. Layer (2012) Effects of heavy ionizing radiation on neuronal development, as analyzed in the retina of chick embryos, GSI Scientific report, 440

Poster und Konferenzbeiträge

M. Mayer, O. Arrizabalaga, S. Ritter and C. Thielemann, Electrophysiological effects of ionizing radiation on neuronal network communication of human embryonic stem cell derived neurospheres, GBS, Erlangen, Deutschland, 2016

O. Arrizabalaga, S. Sadeghi, M. Mayer, I. Schröder, C. Thielemann and S. Ritter, Human neural stem cell response to ionizing radiation, ERR, Amsterdam, Niederlande, 2016

M. Mayer, O. Arrizabalaga, S. Ritter and C. Thielemann, Human Embryonic Stem Cell Derived Neurospheres – A Novel Three Dimensional Model For Neurotoxicological Studies, MEA Meeting, Reutlingen, Deutschland, 2016

O. Arrizabalaga, M. Mayer, S. Sadeghi, S. Kadereit, S. Ritter and C. Thielemann, Human embryonic stem cell-derived neural stem cells: a powerful model to investigate the regenerative capacity of the brain after an insult, ISSCR/CRTD, Dresden, Deutschland, 2016

M. Mayer, O. Arrizabalaga, S. Sadeghi, S. Kadereit, S. Ritter and C. Thielemann, Human embryonic stem cell derived neurospheres: a powerful model to investigate ionizing radiation effects on neuronal differentiation, GBS, Dresden, Deutschland, 2015

M. Mayer, *In Vitro* Untersuchungen zur Wirkung von dicht und dünn ionisierender Strahlung auf die frühe pränatale Entwicklung, Beitrag zum 2. Projektstatusgespräch zur BMBF-geförderten Nuklearen Sicherheitsforschung, Dresden, Deutschland, 2015

M. Mayer, S. Ritter and C. Thielemann, Electrophysiological Effects of Ionizing Radiation on the Network Development of Neurons *in vitro*, GBS, Tübingen, Deutschland, 2014

M. Mayer, S. Ritter, S. Kadereit and C. Thielemann, Electrophysiological Effects of Ionizing Radiation on the Early Prenatal Development in human embryonic stem cells *in vitro*, GBS, Darmstadt, Deutschland, 2013

N. Kaiser, M. Mayer, F. Frohns, P. Layer, Biological Effects of Radiation on the Central Nervous System, as analyzed in Embryonic Chicken Retina (IBER), GBS, Darmstadt, Deutschland, 2013